UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1970 — N° 592

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS INSECTICIDES DE PLUSIEURS DÉRIVÉS DU DIPHÉNYL-TRICHLORÉTHANE

INFLUENCE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le samedi 17 janvier 1970

PAR

Monique ROUGÉ, *née* **GIRAUDEAU**

PHARMACIEN

née à Villagrains (Gironde), le 18 mai 1944

Examinateurs de la thèse :

MM. BAILENGER, Professeur ..... *Président*

PAUTRIZEL, Professeur ..... *Juges.*

GOLSE, Professeur ..... *Juges.*

TRIBOULET, chargé des fonctions de Maître de Conférences ..... *Juges.*

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543508_0004

UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1970 — N° 592

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS INSECTICIDES DE PLUSIEURS DÉRIVÉS DU DIPHÉNYL-TRICHLORÉTHANE

INFLUENCE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le samedi 17 janvier 1970

PAR

Monique ROUGÉ, *née* **GIRAUDEAU**

PHARMACIEN

née à Villagrains (Gironde), le 18 mai 1944

Examinateurs de la thèse :

MM. BAILENGER, Professeur ..... *Président*

PAUTRIZEL, Professeur ..... *Juges*

GOLSE, Professeur ..... *Juges*

TRIBOULET, chargé des fonctions de Maître de Conférences ..... *Juges*

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MON MARI - A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A NOS MAITRES

DE LA FACULTE DE MEDECINE

ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

AVANT-PROPOS

Nous ne saurions commencer l'exposé de ce travail sans affirmer notre reconnaissance à ceux qui nous ont aidée à sa réalisation, et ont facilité notre étude.

Nous remercions tous les membres du Laboratoire de Zoologie et Biologie animale pour leur collaboration technique.

Pour leur aide efficace dans la réalisation de ce travail nous exprimons, à Monsieur le Docteur J. TRIBOULET et Madame TRIBOULET, nos vifs remerciements.

Nous sommes reconnaissante à Monsieur le Professeur GOLSE d'avoir bien voulu compter parmi nos juges. Nous l'assurons de nos sentiments de vive gratitude.

Monsieur le Professeur PAUTRIZEL nous a toujours accueillie avec une extrême bienveillance. Nous le prions de bien vouloir accepter l'expression de notre déférente gratitude pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de siéger à notre jury de thèse.

Monsieur le Professeur Agrégé J. BAILENGER, nous a guidé dans l'accomplissement de cette thèse dont il a été l'inspirateur. Ses précieux conseils, qu'il nous a si aimablement et si largement prodigués, ont aplani beaucoup de difficultés. Nous voulons lui exprimer ici notre très profonde gratitude. Puisse ce travail ne pas décevoir sa confiance en nous, et lui apporter l'expression de notre respectueux attachement.

- I N T R O D U C T I O N -

En 1939, MULLER découvre en Suisse les remarquables propriétés insecticides d'un produit de synthèse connu pourtant depuis 1874, le dichloro-diphényl-trichloréthane ou D.D.T.

Cependant, en 1947, pour la première fois, une résistance (10) au D.D.T. est signalée chez Musca domestica. Depuis, la liste des échecs survenus dans la lutte contre les Insectes n'a cessé de croître jusqu'à nos jours. Il ne reste guère de familles entomologiques ayant été soumises à l'action des insecticides qui ne comportent des espèces devenues plus ou moins résistantes à leur égard : l'O.M.S. compte 122 espèces, dont 62 concernant la santé publique, sur lesquelles un insecticide est pratiquement inefficace.

C'est pourquoi les progrès rapides de la synthèse chimique ont mis à notre disposition un nombre considérable de produits. Pourtant, seuls quelques uns se sont révélés efficients.

L'activité du D.D.T. comme anthelminthique est plus discutée. Cependant un ensemble de recherches a montré que des dérivés voisins comportant le même noyau du diphényl-trichloréthane possédent une certaine toxicité vis-à-vis des vers parasites de la souris.

En 1967-1968 DARRIGER, AMYOT et DAYRAUT ont synthétisé divers produits issus du diphényl-trichloréthane dont ils n'ont retenu que la valeur anthelminthique et la toxicité pour l'hôte.

Parce que ces nouvelles molécules s'apparentent au D.D.T., et parce que celui-ci possède des propriétés insecticides remarquables,

il nous a paru intéressant d'envisager leur action éventuelle sur les Arthropodes.

La structure type étant celle du D.D.T., la fixation ou la substitution des divers groupements sur les noyaux aromatiques nous renseignera peut-être sur l'importance pharmacologique de la nature des radicaux et de leur position sur la molécule.

Nous considérons ces produits comme dérivant les uns des autres de la façon suivante (tableau I).

Nous sommes ainsi conduits à l'étude de cinq dérivés du diphényl-trichloréthane. Nous rappelons brièvement dans un premier chapitre les modalités de leur synthèse telles que les ont décrites leurs auteurs, leurs caractères généraux, leur toxicité à l'égard de la souris, et leur activité anthelminthique sur deux vers, parasites intestinaux de la souris : Syphacia obvelata (Nématode oxyuridé) et Hymenolepis nana (Cestode).

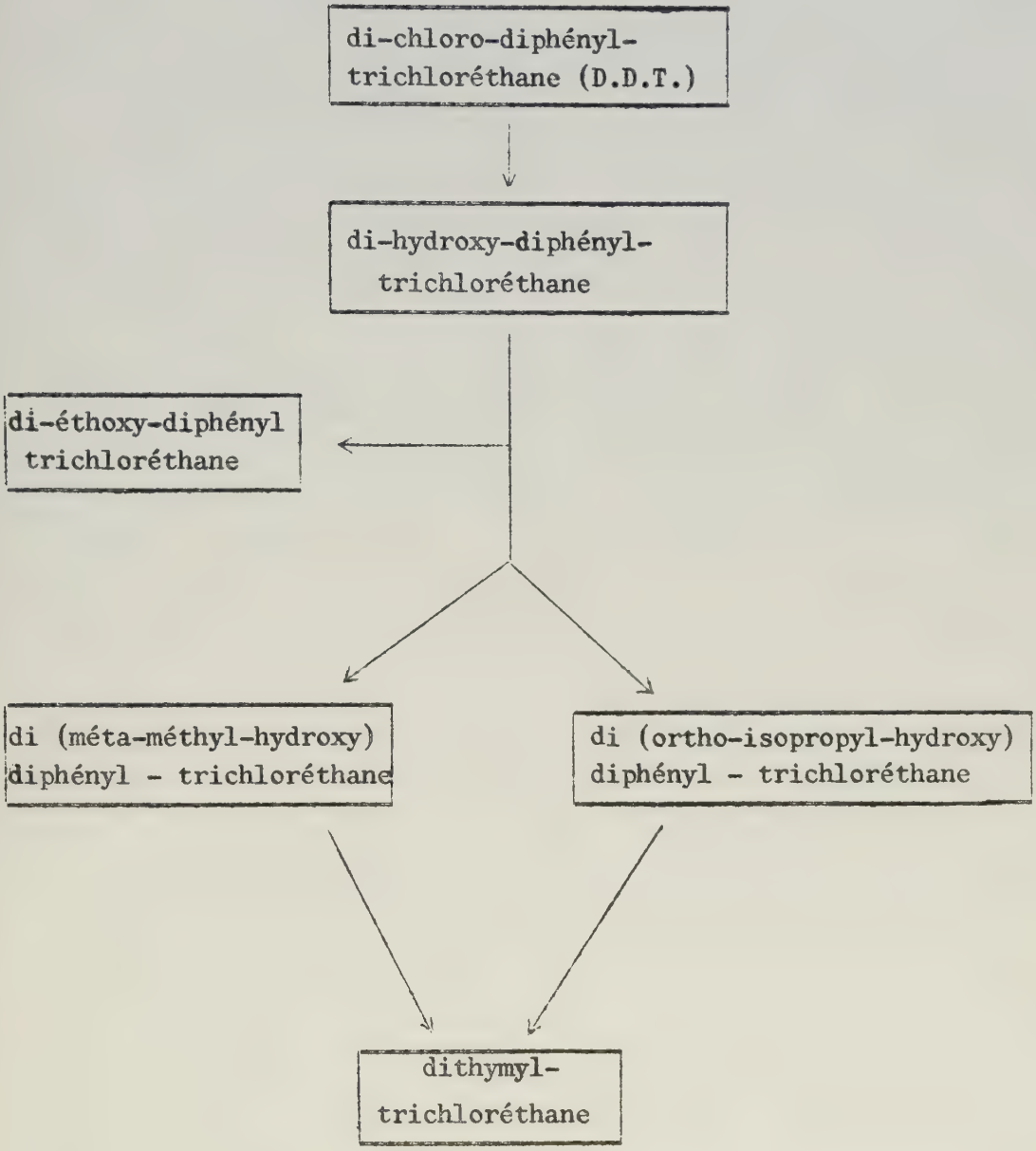
Dans un deuxième chapitre, nous essayons de mettre en valeur leur efficacité insecticide par des méthodes appropriées.

Enfin, dans un dernier chapitre, nous comparons les résultats obtenus avec ces six produits, D.D.T. y compris, quant à leur activité insecticide ; nous les comparons aussi à ceux rapportés par BAILENGER, AMYOT et DAYRAUT quant à leur pouvoir anthelminthique et à leur toxicité.

La comparaison entre les structures cuticulaires des Insectes et des Helminthes permettra peut-être d'aider à la compréhension de certains points encore obscurs : nous pensons notamment aux conditions de substitution que doit remplir la structure type de la molécule pour être capable, d'une part, de franchir les téguments et d'autre part, de manifester une activité en perturbant quelque processus vital.

TABLEAU I

D.D.T. ET SES DERIVES



PREMIERE PARTIE

E T U D E B I B L I O G R A P H I Q U E

I

SYNTHESES

BAILENGER, AMYOT et DAYRAUT (2, 3, 4, 6) ont étudié les modifications apportées à la toxicité et à l'activité anthelminthique du diphényl-trichloréthane par substitution de certains radicaux sur les noyaux aromatiques de cette molécule.

Ils ont ainsi synthétisé plusieurs composés selon des techniques dérivées de celle qui permit à ZEIDLER, en 1874, la préparation du D.D.T. : condensation de deux noyaux benzéniques avec une molécule de chloral anhydre, en milieu acétique, sous l'influence déshydratante de l'acide sulfurique concentré, et à une température inférieure à + 15° C. Ces auteurs ont ainsi préparé :

- le dihydroxy-diphényl-trichloréthane, selon une technique décrite par MEER (18) ; le phénol est le noyau benzénique utilisé ;
- le diéthoxy-diphényl-trichloréthane, selon les indications données par DHINGRA (7) ; le noyau benzénique est le phénate d'éthyle ;
- le dithymyl-trichloréthane, en unissant deux molécules de thymol par un pont trichloréthane, selon une technique voisine de celle utilisée par JAGER (14).

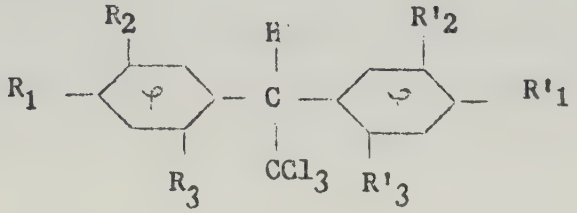
Poursuivant l'étude de cette dernière substance ces auteurs ont dissocié l'importance des radicaux méthyl et isopropyl associés à l'hydroxyl dans la position qu'ils occupent dans la molécule de thymol. Deux nouveaux corps ont donc été synthétisés :

- le di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane,
- le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane;

Pour ceux-ci, le méta-crésol et l'ortho-isopropyl-phénol sont les noyaux benzéniques correspondants.

Leurs méthodes de purification tiennent compte des caractères de solubilité propres à chaque composé dans divers solvants organiques.

Si la structure type est la suivante, ces substitutions se résument ainsi :



1 -	R_1 et R'_1 : - cl	dichloro-diphényl-trichloréthane
2 -	R_1 et R'_1 : - OH	dihydroxy-diphényl-trichloréthane
3 -	R_1 et R'_1 : - OC_2H_5	diéthoxy-diphényl-trichloréthane
4 -	R_1 et R'_1 : - OH R_3 et R'_3 : - CH_3	di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane
5 -	R_1 et R'_1 : - OH R_2 et R'_2 : - $CH<^{CH_3}_{CH_3}$	di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane
6 -	R_1 et R'_1 : - OH R_2 et R'_2 : - $CH<^{CH_3}_{CH_3}$ R_3 et R'_3 : - CH_3	dithymyl-trichloréthane

II

CARACTERES GENERAUX

Du point de vue physico-chimique toutes ces substances sont des poudres microcristallines, insolubles dans l'eau, très solubles dans l'acétone. Dans les autres solvants organiques (éther de pétrole, benzène, alcool éthylique absolu, éther sulfurique, huiles) leur solubilité varie dans de larges proportions.

III

TOXICITES

La détermination de la toxicité revient à la recherche de la DL_{50} à l'égard de la souris. BAILENGER et coll. effectuent un tubage gastrique d'une suspension, aussi homogène et aussi stable que possible, du produit dans un excipient visqueux : soit dans du sirop simple dilué (100 ml de sirop de sucre pour 110 ml d'eau distillée), soit dans une solution de gomme arabique (0,2 pour 100). Les résultats, rapportés par eux, sont les suivants :

Substituants	- cl	- OH	- OC_2H_5	-OH (1) $-CH<^{CH_3}_{CH_3}$ (2)	-OH (1) $-CH_3$ (3)	-OH (1) $-CH<^{CH_3}_{CH_3}$ (2) $-CH_3$ (3)
DL_{50} en g/kg	Sans huile 0,53 Avec huile 0,20	3,20	Sans huile > 8,00 Avec huile 0,33	2,53	1,30	7,3

(1), (2), (3) : positions des substituants sur la molécule type.

Ces molécules présentent donc une toxicité très variable à l'égard de l'hôte : le D.D.T. est nettement le produit le plus toxique. Le remplacement du chlore en para par un groupe hydroxyl diminue sensiblement la toxicité. L'association de l'hydroxyl soit au méthyl, soit à l'isopropyl, soit aux deux groupements fixés simultanément, conduit à des substances de toxicité décroissante, la dernière étant négligeable. Enfin, le blocage de l'hydroxyl par éthylation rend le diéthoxy-diphényl-trichloréthane pratiquement atoxique.

IV

ACTIVITES ANTHELMINTHIQUES

BAILENGER et coll. évaluent l'activité anthelminthique par des essais "in vivo" sur la souris infestée par Syphacia obvelata (Nématode oxyuridé) et Hymenolepis nana (Cestode).

Le produit est administré par tubage gastrique, sous forme d'une suspension dans une solution aqueuse visqueuse, et à raison d'une prise quotidienne pendant 6 jours, ou d'un traitement en un seul jour par une dose répartie en une ou deux prises.

Les animaux servant de témoins reçoivent un égal volume de la suspension visqueuse.

L'autopsie est pratiquée 2 à 3 jours après la fin du traitement. Les vers sont recherchés et numérés. Les résultats sont exprimés par deux pourcentages traduisant :

- la proportion d'animaux déparasités ;
- la réduction du nombre moyen de vers ;

chaque pourcentage tient compte du déparasitage spontané tel qu'il se manifeste dans les lots témoins.

Les résultats, rapportés par BAILENGER et DAYRAUT, sont les suivants :

TABLEAU II

ACTIVITES ANTHELMINTHIQUES COMPAREES DES DERIVES DU DIPHENYL-TRICHLORETHANE ETUDIES

Nature des Sustituants	DOSES ACTIVES EN g/Kg		
	Déparasitage de 50 % des Souris	Réduction de 50 % du nombre de vers	
- cl	Très peu actif	-	SYPHACIA OBVELATA
- OH	0,650	0,400	
- OC_2H_5	Peu actif	-	
- OH (1) - $CH(CH_3)_2$ (2)	0,200	0,050	
- OH (1) - CH_3 (3)	0,200	0,150	
- OH (1) - $CH(CH_3)_2$ (2) - CH_3 (3)	0,250	0,075	
- cl	Inactif	-	HYMENOLEPIS NANA
- OH	Inactif	-	
- OC_2H_5	Inactif	-	
- OH (1) - $CH(CH_3)_2$ (2)	0,150	0,150	
- OH (1) - CH_3 (3)	Très peu actif	-	
- OH (1) - $CH(CH_3)_2$ (2) - CH_3 (3)	Inactif	-	

(1), (2), (3) : positions des substitutions sur la molécule-type.

Le tableau II montre que, sur Syphacia obvelata, le D.D.T. est pratiquement inactif. Le remplacement du chlore en para par un hydroxyl accroît sensiblement l'efficacité. Deux orientations se présentent ensuite :

- le blocage de l'hydroxyl par éthylation conduit à une molécule d'effet anthelminthique amoindri ;
- le maintien de l'hydroxyl associé soit au méthyl, soit à l'isopropyl, soit à ces deux groupements simultanément, renforce l'activité par rapport à la molécule initiale.

Cependant, seule l'association hydroxyl-isopropyl se révèle efficace à l'égard d'Hymenolepis nana.

DEUXIEME PARTIE

E T U D E E X P E R I M E N T A L E

L'auteur américain MAPLE démontre d'une façon fort élégante que le D.D.T. manifeste son pouvoir toxique par contact. Il soumet des larves de Moustique Anopheles quadrimaculatus à l'action de solutions huileuses colorées de D.D.T. : le produit pénétre à travers le tégument sans que le système trachéal ou digestif soit coloré.

C'est donc par contact que nous allons essayer de détecter et d'évaluer une toxicité possible (16,17) à l'égard de certains Insectes.

Nous avons retenu :

- deux Diptères : Calliphora erythrocephala ; adultes ;
  Anopheles stephensi : larves et adultes ;
- un Hétéroptère : Rhodnius prolixus : nymphes et adultes ;
- un Orthoptère : Blatella germanica : adultes.

Les méthodes décrites dérivent de celles proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé. Le principe est le suivant : des lots d'Insectes sont exposés à des concentrations variables de chaque dérivé en vue de déterminer le pourcentage de mortalité à chacune d'elles. Seul le temps de contact est constant, mais évidemment différent d'une espèce à l'autre.

Nos comparaisons sont basées sur la recherche de la CL_{50}, concentration d'insecticide tuant la moitié des animaux éprouvés, ainsi que sur la CL_{90}, concentration qui tue 90 % des animaux en expérience. C'est cette dernière que l'on a plutôt tendance à retenir à l'heure actuelle.

Dans tous les cas une épreuve préliminaire permet d'approcher l'ordre de grandeur du degré de sensibilité à prendre en considération dans la suite des opérations.

Avec les valeurs obtenues nous établissons des courbes de référence (25) dose-mortalité, auxquelles peut être rapporté le comportement de toute autre population des mêmes Insectes, soumis à des conditions expérimentales rigoureusement identiques.

Les épreuves sont arbitraires. En effet, la gamme des concentrations utilisées dépend de la durée d'exposition et, le cas échéant, de la période d'observation ultérieure, choisie pour l'évaluation de la mortalité. La température, l'humidité, l'âge des Insectes ou leur stade évolutif, le sexe, l'éclairement, l'état de nutrition, paraissent des facteurs nécessaires à respecter pour que l'essai soit reproductible. Toute modification sensible de ces conditions implique un changement prononcé des résultats.

I

ETUDE SUR CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

La méthode décrite ci-après utilise la Mouche Calliphora erythrocephala (MEIGEN) Diptère, Brachycère Calliphoridé, ou "Mouche bleue".

A - Conditions d'élevage

Nous introduisons quelques spécimens adultes dans une cage de forme cubique (figure 1), de 40 cm d'arête, garnie de tulle fin. De l'eau, du glucose pulvérulent suffisent à leur nourriture. Mais, pour favoriser la ponte, nous leur donnons de la viande de boeuf hâchée, quotidiennement humidifiée, dans un récipient contenu dans un cristallisoir dont le fond est recouvert de sciure sur une épaisseur de 4 à 5 centimètres. Les cages sont violemment éclairées 2 à 3 heures par jour pour accélérer la copulation.

Les larves éclosent en quelques heures, se développent au sein de la viande pendant 4 à 5 jours, puis migrent vers la sciure où elles se transforment en pupes. Recueillies, mises dans une cage identique à la précédente, elles donnent naissance à l'insecte parfait, et le cycle recommence.

A une température comprise entre 20° C et 25° C, dans un local où ne règnent pas des conditions extrêmes d'humidité, la transformation complète dure 20 jours environ. Les adultes ne sont utilisés qu'âgés de 3 à 14 jours.

B - Principe

Les Calliphora, réparties en lots mixtes, sont amenées au contact de chacun des six produits. Ceux-ci sont dissous dans un liquide organique volatil permettant, après évaporation, d'enduire les parois des récipients d'épreuves d'un film microcristallin uniforme (20).

Par des études préliminaires, nous avons déterminé la sensibilité minimum et maximum des Mouches aux diverses substances. Les résultats rapportés tiennent évidemment compte de ces premiers essais.

Nous opérons à des concentrations variables, régulièrement progressives. Le temps de contact, ou temps pendant lequel les Diptères sont soumis au dépôt cristallin, est constant ; il est cependant théorique puisqu'ils ne sont pas immobilisés.

Il peut arriver que, lorsque l'Insecte est intoxiqué, il subisse d'abord ce que les anglo-saxons appelent le "knock-down". Il présente alors, dans un premier temps, une incoordination neuro-musculaire, puis une inaptitude au vol. Or knock-down et mort ne sont pas obligatoirement liés ; c'est le rôle de la période d'observation, d'une durée limitée et constante, de distinguer entre les Mouches simplement "choquées", capables de "récupérer", et celles qui mourront.

La mortalité enregistrée est éventuellement corrigée en fonction de celle du témoin. La proportion de mâles et de femelles est déterminée à ce moment ; la différenciation des sexes avant l'essai, risquant de traumatiser les Insectes.

C - Méthode d'Etude

1°) Matériel

Les flacons à traiter (figure 2), en verre Pyrex, présentent une partie cylindrique de 6 cm de hauteur, munie d'un fond de 4,5 cm de diamètre interne, surmontée d'une aire tronconique dont la portion de génératrice mesure 2 cm. La surface interne, ou surface de contact, est de 122 cm^2 environ, le volume de 118 ml.

2°) Technique

Dans un ballon jaugé nous préparons une solution-mère en dissolvant 2,5 mg de poudre dans 25 ml de liquide organique, généralement de l'acétone pure. Mais en ce qui concerne le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane et le di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane il s'agit de benzène R. P. : leur solution dans l'acétone laisse sur le verre un dépôt d'aspect et de consistance résineuse qui colle les ailes des Mouches.

Le nombre de ml à introduire dans chacun des flacons décrits est fonction de la concentration désirée dans un rapport qui figure ci-dessous ; la concentration la plus faible étant obtenue en prélevant 0,122 ml de la solution-mère diluée au 1/10 dans l'acétone.

Concentrations en mg/m^2	0,1	1	2	4	6	8	10
Nombre de ml	0,122	0,122	0,244	0,488	0,732	0,976	1,220

Introduits directement dans les flacons, les volumes ci-dessus sont complétés à 1,220 ml avec le solvant. Le témoin reçoit lui-même 1,220 ml de solvant.

L'acétone ou le benzène sont évaporés par rotation manuelle des récipients en position inclinée. Toute odeur doit avoir disparu avant l'introduction des Insectes.

Les Mouches sont d'abord légèrement anesthésiées par refroidissement (15 minutes au réfrigérateur à + 4° C), choisies de même taille, les ailes intactes, puis réparties par lots de 25.

Les flacons sont fermés avec un capuchon de tulle. Dans un premier temps, nous les maintenons en position horizontale pendant une heure, en les faisant tourner d' 1/4 de tour toutes les 15 minutes.

Pendant cette période les Calliphora sont soumises à l'éclairage d'un tube au néon placé à 0,60 mètre à peu près.

Le deuxième temps de l'épreuve commence à la fin de cette phase d'exposition. Sans manipulation des Insectes aux-mêmes, nous les transférons dans des récipients identiques aux précédents, mais dont les parois internes sont nettes de toute trace de produit. Pour cela, nous plaçons les flacons col à col (figure 3) et nous mettons à profit le phototropisme positif des Diptères : ceux-ci sont attirés par la lumière vive qui éclaire le nouveau flacon. C'est la période d'observation ; elle dure 24 heures. La mortalité est enregistrée au bout de ce temps.

Pour l'ensemble de ces essais, nous avons enregistrée des écarts de température de 1° C (23° C - 24° C) et du pourcentage d'humidité de 49 % à 55 %.

Les survivants sont tués à l'acétate d'éthyle ; nous procédons alors à la détermination des sexes. Celle-ci est basée sur les dépendances externes de l'appareil copulateur, visibles à l'oeil nu.
Il s'agit :

- chez les mâles des pièces chitineuses qui représentent le 10ème segment abdominal (figure 4) ;
- chez les femelles des segments abdominaux qui, modifiés à partir du 6ème, forment l'ovipositeur rétractile à l'intérieur du corps (figure 5) ; il fait saillie si nous pressons sur l'abdomen, ou si nous tirons à la pince fine.

D - Résultats

Est considéré comme mort tout Insecte en position dorsale ou incapable de se mouvoir.

Le pourcentage de mortalité se calcule de la façon suivante :

$$\frac{(\text{Nombre de morts dans l'épreuve} - \text{Nombre de morts dans le témoin}) \times 100}{\text{Nombre de Mouches en expérience} - \text{Nombre de morts dans le témoin.}}$$

1°) - Tableaux

Etude sur Calliphora erythrocephala

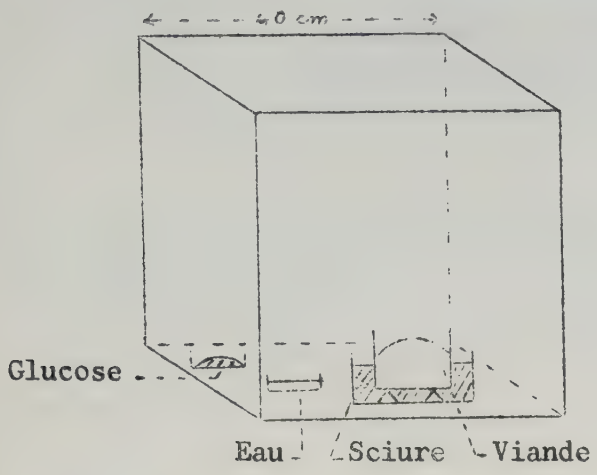


Fig. 1 : Cage à Mouches

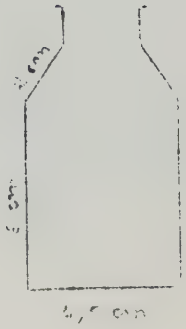


Fig. 2 : Récipient d'Epreuve

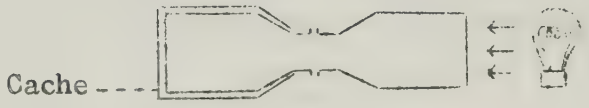


Fig. 3 : Transfert des Insectes

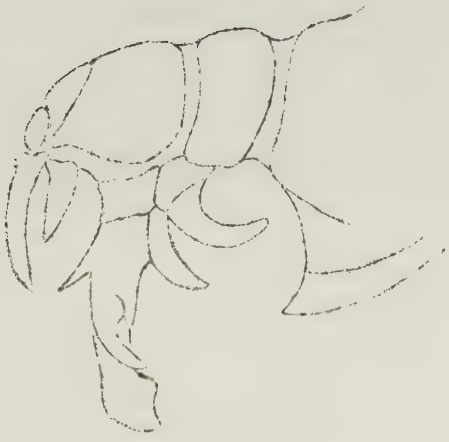


Fig. 4 : Schéma de l'appareil copulateur mâle (profil)

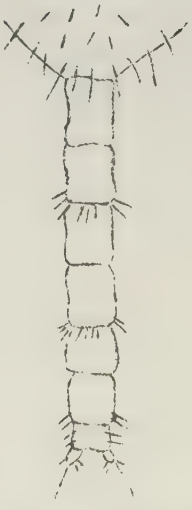


Fig. 5 : Oviscapte de la femelle (face sternale)

TABLEAU III

ACTIVITE DU D.D.T. SUR CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

Concentration en mg/m²	Nombre de Mouches	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité corrigé*
D.D.T.					
0,1	25	17	8	1	0 %
1	25	12	13	1	0 %
2	25	13	12	3	8,3 %
4	25	9	16	13	50 %
6	25	15	10	24	95,8 %
8	25	15	10	25	100 %
10	25	11	14	25	100 %
Témoin					
Acétone seule	25	10	15	1	

* Chaque pourcentage tient compte de la mortalité spontanée telle qu'elle se manifeste dans les lots témoins.

TABLEAU IV

ACTIVITE DU DIETHOXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE SUR CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

Concentration en mg/m^2	Nombre de Mouches	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
Di-éthoxy-diphényl-trichloréthane					
0,1	25	16	9	0	0 %
1	25	14	11	3	12 %
2	25	13	12	9	36 %
4	25	12	13	21	84 %
6	25	14	11	24	96 %
8	25	12	13	25	100 %
10	25	16	9	25	100 %
Témoin					
Acétone seule	25	12	13	0	

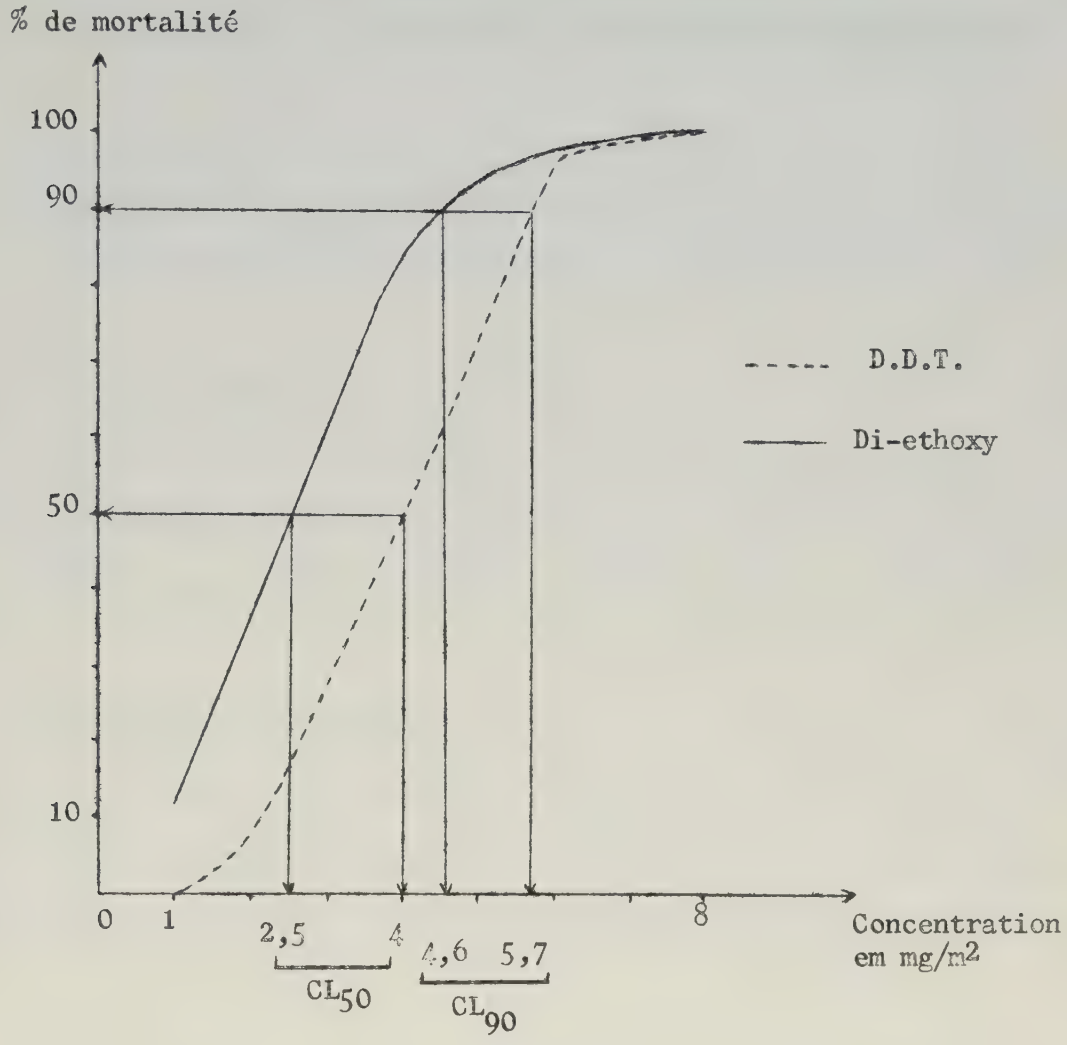


Figure 6 : Activités comparées du D.D.T. et du diéthoxy-diphényl-trichloréthane sur Calliphora erythrocephala.

TABLEAU V

ACTIVITES DU DI-HYDROXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE
ET DU DI-THYMYL-TRICHLORETHANE SUR CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

Concentration en mg/m²	Nombre de Mouches	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
Di-hydroxy-Diphényl-trichloréthane					
100	25	14	11	0	0 %
1000	25	10	15	0	0 %
Di-thymyl-trichloréthane					
100	25	13	12	0	0 %
1000	25	9	16	0	0 %
Témoin					
Acétone seule	25	12	13	0	

TABLEAU VI

ACTIVITES DES DERIVES ISO-PROPYL* ET META-CRESOL** SUR CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

Concentration en mg/m^2	Nombre de Mouches	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
Iso-Propyl*					
100	25	15	10	0	0 %
1000	25	12	13	0	0 %
Méta-crésol**					
100	25	11	14	0	0 %
1000	25	15	10	0	0 %
Témoin					
Benzène seul	25	16	9	0	

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane

** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane

2°) Interprétation

Les résultats obtenus avec le diéthoxy-diphényl-trichloréthane comparés à ceux obtenus avec le D.D.T. (tableaux III et IV) permettent, en interprétant les courbes de la figure 6, de dégager les valeurs suivantes :

D.D.T. $\begin{cases} CL_{50} & : 4 \quad mg/m^2 \\ CL_{90} & : 5,7 \quad mg/m^2 \end{cases}$

Di-ethoxy $\begin{cases} CL_{50} & : 2,5 \quad mg/m^2 \\ CL_{90} & : 4,6 \quad mg/m^2 \end{cases}$

Le diéthoxy-diphényl-trichloréthane, essayé en laboratoire sur des Mouches (Calliphora Erythrocephala) sensibles, a donc une valeur insecticide supérieure à celle du D.D.T., testé dans les mêmes conditions.

Tous les autres dérivés (tableaux V, VI), employés à des concentrations 10 et 100 fois plus élevées que celles ayant précédemment donné 100 % de morts, se sont révélés totalement inactifs contre ces Diptères.

II

ETUDE SUR ANOPHELES STEPHENSI

La méthode décrite diffère sensiblement, pour des raisons pratiques, de celle proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (21). Nous avons dû mettre au point toutes les modalités de son application.

Elle utilise le Moustique Anopheles stephensi, Diptère, Nématocère, Culicidé, à l'état adulte. La souche élevée et entretenue à l'unité d'immunologie parasitaire de l'I.N.S.E.R.M. (Professeur PAUTRIZEL) nous a été aimablement remise par le Docteur et Madame TRIBOULEY.

A - Conditions d'élevage

Les nymphes qui nous ont été remises ont été placées en étuve humidifiée, à une température de 25° C - 26° C. Peu de temps après elles donnent naissance à des adultes. Ceux-ci ne servent à l'expérimentation qu'âgés de 2 à 6 jours. Ils se nourrissent d'eau glucosée à 10 % dont on imbibe un tampon de coton hydrophile.

B - Principe

Les substances sont mises en solution dans un solvant organique volatil. Une étude préliminaire nous a permis de déterminer la sensibilité maximum et minimum de ces Insectes à chacun des 6 produits étudiés. Nous soumettons des lots mixtes de Moustiques à l'action d'une pellicule microcristalline déposée sur la paroi interne des récipients d'épreuves. Le temps pendant lequel les Anophèles sont maintenus au contact du dépôt est fixe. Comme précédemment, il s'agit d'un temps théorique puisque les Insectes ont la possibilité de voler.

Les morts sont dénombrés à l'expiration de ce temps. Le pourcentage de mortalité tient compte de la mortalité spontanée susceptible de se manifester dans le témoin.

Etant donné la difficulté de différencier les sexes avant l'[illegible] sans traumatiser les Diptères, la composition de la population se détermine après.

Anopheles stephensi est une espèce africaine ; c'est dire que température et humidité doivent être élevées, les écarts thermiques et les variations hygrométriques réduits. Ces valeurs essentielles, enregistrées au début et à la fin de l'épreuve sont communiquées en même temps que les résultats.

C - Méthode d'étude

1°) Matériel

Les récipients qui servent à l'exposition sont les mêmes que ceux précédemment utilisés pour Calliphora erythrocephala (figure 2) : flacons en verre Pyrex, présentant une partie cylindrique de 4,5 cm de diamètre interne et de 6 cm de hauteur, surmontée d'une aire tronconique dont la portion de génératrice mesure 2 cm. Le col s'ouvre largement. La surface interne est de 122 cm^2 environ, le volume de 118 ml.

2°) Technique

Nos études préliminaires montrent l'inutilité d'élever la concentration au-delà de 10 mg de produit par m^2. Cela revient à peser 2,5 mg de chaque substance et à la dissoudre, en ballon jaugé, dans 25 ml du solvant choisi. Il s'agit, le plus souvent, de l'acétone pure ou, seulement pour le di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane, et le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane, du benzène R.P. En effet, la solution acétonique de ces 2 dérivés laisse sur le verre un dépôt de consistance résineuse qui colle les ailes des Moustiques.

En ce qui concerne le D.D.T., le diéthoxy-diphényl-trichloréthane, le dithymyl-trichloréthane, il est nécessaire d'abaisser considérablement la quantité de produit dissout en diluant au 1/10, la solution mère. Les doses, en mg/m^2, sont :

0,1 0,01 0,001 0,0001 0,00001

Nous introduisons 1,22 ml de liquide avec une pipette graduée au 1/100 de ml. Les témoins reçoivent eux-mêmes 1,22 ml d'acétone pure ou de benzène R.P. suivant le cas. La rotation manuelle de la fiole en position inclinée permet de chasser le solvant et d'enduire la paroi interne d'un film microcristallin uniforme. Toute odeur doit avoir disparu avant d'introduire les Insectes.

Les Moustiques sont capturés en prenant les précautions nécessaires pour éviter une altération quelconque : on utilise un tube d'aspiration (figure 7) branché sur une trompe à vide dont le débit est convenablement réglé. Les Diptères sont ensuite répartis à raison de 10 par récipients, fermés avec un capuchon de tulle. Du coton hydrophile imbibé d'eau glucosée à 10 %, posé sur le tulle, assure leur nourriture.

Tous les flacons, en position verticale, ainsi qu'un thermomètre de précision et un hygromètre, sont placés dans une cage en plastique ne laissant passer qu'une lumière diffuse modérée. Un linge maintenu humide, qui assure à la fois une température constante et une hygrométrie élevée, recouvre la cage.

La période d'exposition dure 24 heures. La mortalité est enregistrée au bout de ce temps.

Nous procédons alors à la détermination des sexes sur les Insectes morts ou, s'ils survivent, tués à l'acétate d'éthyle. Elle est basée sur un dimorphisme au niveau des antennes : celles des mâles (figure 8) sont plumeuses, celles des femelles (figure 9) sont munies de soies peu nombreuses et courtes.

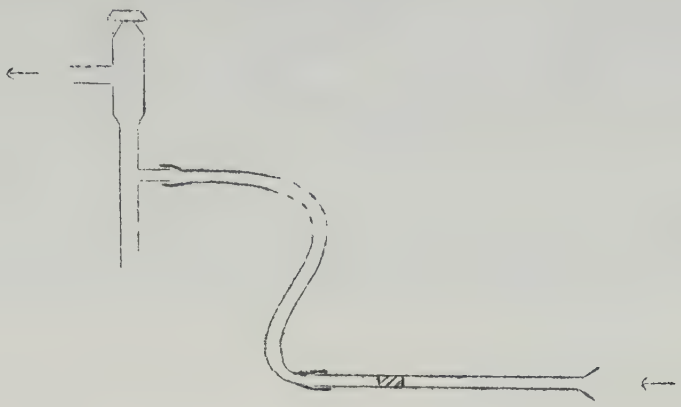


Fig. 7 : Tube d'aspiration

Fig. 8 : Antenne d'un Culicidae mâle

Fig. 9 : Antenne d'un Culicidae femelle

D - Résultats

1 - Tout Insecte incapable de marcher est compté comme mort ;

2 - Nous ne retenons, pour les témoins, que les taux de mortalité inférieurs à 20 % ;

3 - Le pourcentage de mortalité se calcule de la façon suivante :

$$\frac{(\text{Nb de morts dans l'épreuve} - \text{Nb de morts dans le témoin}) \times 100}{(\text{Nb de Moustiques en expérience} - \text{Nb de morts dans le témoin.}}$$

4 - Les courbes de sensibilité (figure 10) devraient être tracées sur papier semi-logarithmique ; mais en raison de l'étalement des concentrations il ne nous est pas possible d'utiliser ce papier.

1°) Tableaux

TABLEAU VII

ACTIVITES DU D.D.T. ET DU DIETHOXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE SUR ANOPHELES STEPHENSI

Température : 26° C - 25° C
Humidité : 95 % - 94 %

Concentration en mg/m2	Nombre de Moustiques	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
D.D.T.					
0,1	10	6	4	10	100 %
0,01	10	5	5	10	100 %
0,001	10	4	6	6	60 %
0,0001	10	4	6	0	0 %
Di-éthoxy-diphényl-trichloréthane					
0,1	10	4	6	10	100 %
0,01	10	4	6	9	90 %
0,001	10	5	5	2	20 %
0,0001	10	4	6	0	0 %
Témoin					
Acétone seule	10	5	5	0	

TABLEAU VIII

ACTIVITES DU D.D.T. ET DU DIETHOXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE SUR ANOPHELES STEPHENSI

Température : 22° C - 22° 5

Humidité : 94 % - 94 %

Concentration en mg/m^2	Nombre de Moustiques	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité corrigé*
D.D.T.					
0,1	15	5	10	15	100 %
0,01	15	4	11	15	100 %
0,001	15	12	3	8	50 %
0,0001	15	5	10	0	0 %
Diéthoxy-diphényl-trichloréthane					
0,1	15	6	9	15	100 %
0,01	15	7	8	14	92,8 %
0,001	15	4	11	4	21,4 %
0,0001	15	11	4	2	7,1 %
Témoin					
Acétone seule	15	7	8	1	

* Chaque pourcentage tient compte de la mortalité spontanée telle qu'elle se manifeste dans les lots témoins.

TABLEAU IX

ACTIVITES DU DITHYMYL-TRICHLORETHANE ET DU DIHYDROXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE SUR ANOPHELES STEPHENSI

Température : 26° C - 25° 5
Humidité : 95 % - 94 %

Concentration en mg/m^2	Nombre de Moustiques	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
Di-thymyl-trichloréthane					
0,1	10	4	6	10	100 %
0,01	10	4	6	9	90 %
0,001	10	6	4	7	70 %
0,0001	10	6	4	3	30 %
0,00001	10	5	5	1	10 %
Di-hydroxy-diphényl-trichloréthane					
10	10	7	3	1	10 %
Témoin					
Acétone seule	10	3	7	0	

TABLEAU X

ACTIVITES DU DITHYMYL-TRICHLORETHANE

ET DU DI-HYDROXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE SUR ANOPHELES STEPHENSI

Température : 23° 5 - 22° 5

Humidité : 92 % - 92 %

Concentration en mg/m^2	Nombre de Moustiques	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
Di-thymyl-trichloréthane					
0,1	15	3	12	15	100 %
0,01	15	5	10	15	100 %
0,001	15	7	8	13	86,6 %
0,0001	15	6	9	6	40 %
0,00001	15	6	9	1	6,6 %
Di-hydroxy-diphényl-trichloréthane					
10	15	9	6	4	26,6 %
Témoin					
Acétone seule	15	2	13	0	

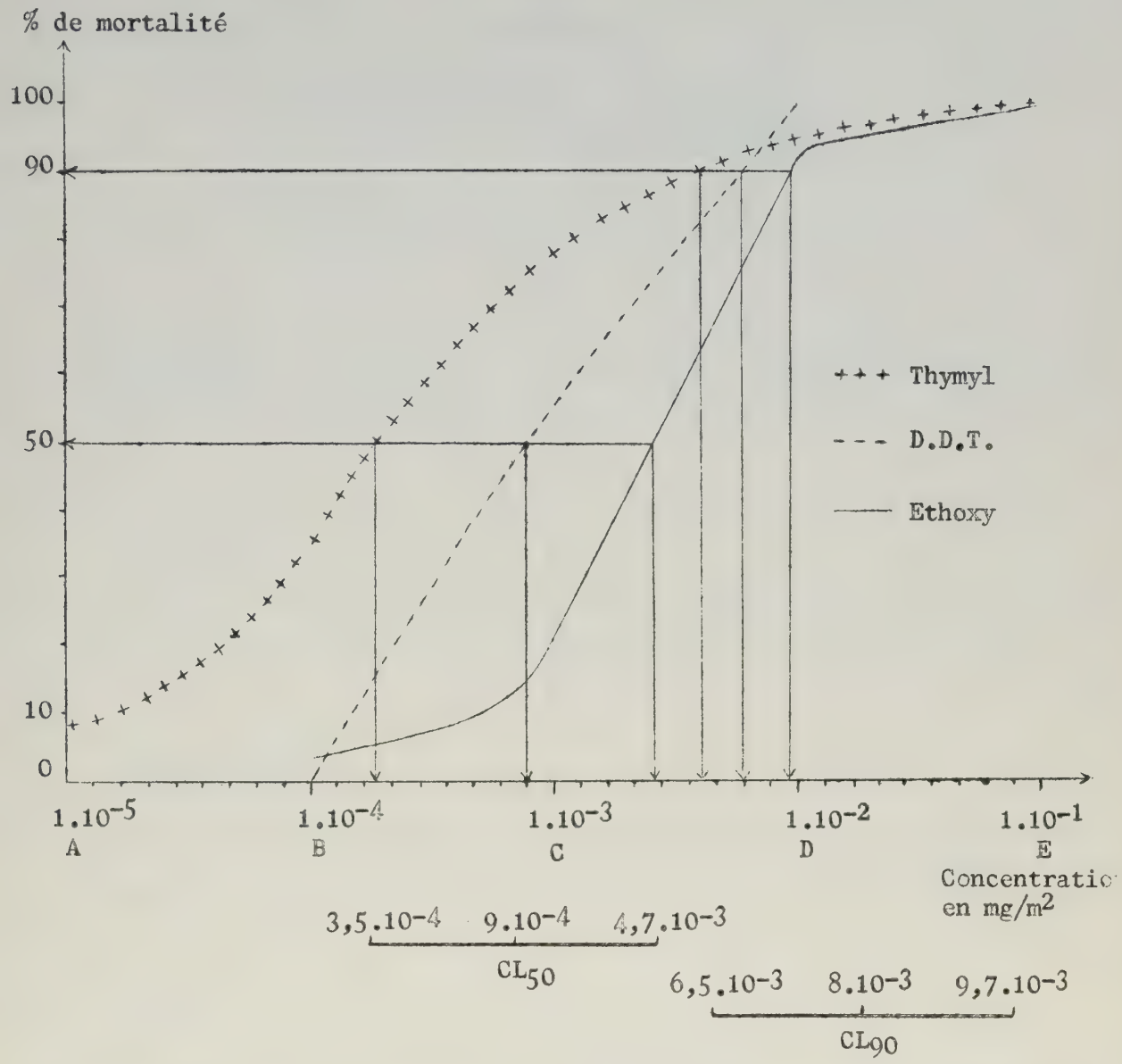


Figure 10 : Activités comparées du D.D.T., du diéthoxy-diphényl-trichloréthane et du Di-thymyl-trichloréthane sur Anopheles stephensi

Entre A et B chaque intervalle équivaut à 1.10^{-5} mg/m^2
Entre B et C chaque intervalle équivaut à 1.10^{-4} mg/m^2
Entre C et D chaque intervalle équivaut à 1.10^{-3} mg/m^2
Entre D et E chaque intervalle équivaut à 1.10^{-2} mg/m^2

TABLEAU XI

ACTIVITES DES DERIVES ISO-PROPYL* ET META-CRESOL** SUR ANOPHELES STEPHENSI

Température : 24° C - 24° C
Humidité : 93 % - 95 %

Concentration en mg/m^2	Nombre de Moustiques	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
Iso-propyl*					
10	10	4	6	0	0 %
Méta-crésol**					
10	10	5	5	2	20 %
Témoin					
Benzène seul	10	7	3	0	

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane

** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane

TABLEAU XII

ACTIVITES DES DERIVES ISO-PROPYL* ET META-CRESOL** SUR ANOPHELES STEPHENSI

Température : 23° 5 - 22° 5
Humidité : 92 % - 92 %

Concentration en mg/m^2	Nombre de Moustiques	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité corrigé [1]
Iso-propyl*					
10	15	8	7	1	0 %
Méta-crésol**					
10	15	7	8	0	0 %
Témoin					
Benzène seul	15	8	7	1	

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane;

** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane;

1 Chaque pourcentage tient compte de la mortalité spontanée telle qu'elle se manifeste dans les lots témoins.

2°) Interprétation

Ces Anophèles, souche sensible, réagissent bien au D.D.T. comme nous nous y attendions. Parmi les cinq autres dérivés étudiés le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane et le di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane sont inactifs (tableaux XI, XII) ; le di-hydroxy-diphényl-trichloréthane est pratiquement dépourvu de pouvoir insecticide.

Seuls le diéthoxy-diphényl-trichloréthane et le dithymyl-trichloréthane (tableaux VII, VIII, IX, X), se révèlent particulièrement intéressants. Les courbes, tracées à l'aide des résultats obtenus, permettent de déterminer et de comparer les concentrations létales (figure 10) :

D.D.T. CL_{50} : 0,0009 mg/m^2 ; CL_{90} : 0,008 mg/m^2

di-éthoxy CL_{50} : 0,0047 mg/m^2 ; CL_{90} : 0,0097 mg/m^2

di-thymyl CL_{50} : 0,00035 mg/m^2 ; CL_{90} : 0,0065 mg/m^2

Ces doses montrent qu'il y a tout intérêt à ne pas s'arrêter à la CL_{50} pour définir la valeur insecticide d'un produit. En effet, en isolant cette concentration, il paraît beaucoup plus avantageux d'utiliser d'abord le dithymyl-trichloréthane, puis le D.D.T. et enfin le diéthoxy-diphényl-trichloréthane. Mais avec la CL_{90}, cet ordre n'existe plus ; l'écart entre les concentrations extrêmes se réduit à 3.10^{-3} mg/m^2.

Nous pensons en définitive que ces trois substances doivent être considérées comme également efficaces.

III

ETUDE SUR LES LARVES D'ANOPHELES STEPHENSI

Nous travaillons sur les larves au quatrième stade du Moustique Anopheles stephensi, Diptère, Nématocère Culicidé, élevées comme précédemment à l'unité de Recherche de l'I.N.S.E.R.M. (Professeur PAUTRIZEL).

A - Principe

L'expérimentation à ce stade aquatique du développement de l'imago exige la mise en oeuvre d'une technique tout à fait différente. Il ne s'agit plus d'un dépôt sur une surface solide, mais d'une suspension de cristaux en milieu aqueux (9,22).

Les substances, dissoutes dans l'alcool éthylique, sont incorporées à l'eau. Toutefois, la dose de solvant dans les dilutions finales est beaucoup trop faible pour être de quelque influence sur ces formes larvaires ; les essais témoins le confirment. On admet généralement que le rôle de l'alcool est d'augmenter la stabilité de la suspension en favorisant, au contact de l'eau, la formation de cristaux extrêmement fins, très légers : la sédimentation est, de ce fait, sensiblement ralentie.

Les concentrations cristallines sont variables ; le temps pendant lequel les larves sont soumises à l'action des suspensions est constant. Les morts sont dénombrés à l'expiration de ce temps.

B - Méthode d'Etude

Nous éliminons les larves au quatrième stade présentant des anomalies ; puis nous les répartissons par lots de 25 dans des béchers contenant chacun 100 ml d'eau dépourvue de chlore et d'impuretés

organiques, à la température du local.

Des cristallisoirs en verre de 15 cm de diamètre interne et de 7 cm de hauteur reçoivent 399 ml de cette eau. La nécessité de préparer à l'avance ce matériel paraît évidente : cela permet de réaliser l'équilibre thermique indispensable au bon déroulement des tests. Nous avons attendu environ deux heures.

Nous préparons les milieux d'épreuve en introduisant, à la pipette de précision (pipette de 1 ml graduée au 1/100) dans chaque cristallisoir, sous la surface de l'eau, 1 ml de la solution alcoolique. Nous agitons ensuite énergiquement pendant 30 secondes, avec la pipette. Le témoin reçoit 1 ml d'éthanol absolu.

Trente minutes plus tard nous versons le contenu des béchers, donc les larves, dans les cristallisoirs. A ce moment, la température de l'eau pour l'ensemble de ces essais est de 22° C - 22° 5 et ne varie pas de façon sensible pendant toute la durée de l'expérimentation. Pendant 6h 30 nous éclairons avec un tube au néon placé à 60 cm des récipients, en moyenne.

Le dénombrement des larves mortes et moribondes s'effectue 24 heures après le début du contact.

Nous allons réaliser, sur ces Insectes, deux sortes d'études : l'une avec les produits purs, l'autre avec une association de deux substances. Les résultats sont rapportés séparément.

C - Résultats

L'évaluation de la mortalité prête souvent à discussion. Les critiques portent sur l'appréciation de l'état d'intoxication des larves et de leur possibilité de "récupération", ainsi que sur le moment de cette appréciation par rapport à la fin du contact.

Nous conformant aux indications fournies par l'Organisation Mondiale de la Santé, nous calculons le pourcentage de mortalité à

chaque concentration en additionnant le nombre de larves moribondes et le nombre de larves mortes. On compte comme mortes les larves qui ne bougent pas quand on les touche avec une aiguille au niveau des derniers segments abdominaux ou dans la région cervicale. On considére comme moribondes les larves incapables d'atteindre la surface (dans un laps de temps raisonnable) ou de manifester la réaction de plongée caractéristique quand on agite l'eau ; ces larves peuvent aussi présenter une décoloration, des positions insolites, des spasmes, des mouvements désordonnés ou un état de rigidité.

L'appréciation de "l'état moribond" est délicat et nécessite l'examen individuel des larves.

Compte tenu du témoin, le pourcentage de mortalité à chaque concentration se calcule de la façon suivante :

$$\frac{\text{(Nombre de morts dans l'épreuve - Nombre de morts dans le témoin)} \times 100}{\text{Nombre de larves en expérience - Nombre de morts dans le témoin}}$$

Lorsque les larves donnent naissance, au cours des épreuves à des nymphes parfaitement viables, ces dernières sont comptées comme survivantes.

Lorsque plus de 10 % des larves témoins sont devenues nymphes au cours de l'épreuve, celle-ci est entièrement annulée.

Tout essai dans lequel la mortalité des témoins atteint ou dépasse 20 % est invalidé et recommencé.

La courbe de sensibilité doit être tracée sur papier semi-logarithmique ; mais en raison du très grand étalement des concentrations (les concentrations extrêmes étant 0,000032 p.p.m.* et 0,5 p.p.m.) il ne nous est pas possible d'utiliser ce papier.

* p.p.m. : partie pour million

1°) Produits purs

a) Préparation des dilutions : Les doses ci-dessous indiquées sont les concentrations finales obtenues en diluant dans 499 ml d'eau 1 ml de la solution éthanolique.

2 p.p.m. : 25 mg de produit dans 25 ml d'éthanol absolu en ballon jaugé.

0,5 p.p.m. : 0,5 ml de la solution précédente + 1,5 ml d'éthanol

0,1 p.p.m.
0,02 p.p.m.
0,004 p.p.m.
0,0008 p.p.m.
0,00016 p.p.m.
0,000032 p.p.m.

Chacune des solutions correspondantes étant obtenue en diluant 1 ml de la solution qui la précède avec 4 ml d'éthanol absolu.

b) Tableaux

TABLEAU XIII

ACTIVITE DU D.D.T. SUR LES LARVES D'ANOPHELES STEPHENSI

Concentration en p.p.m.	Nombre de Larves	Nombre de larves moribondes	Nombre de larves mortes	% de mortalité
D.D.T.				
0,5	25	10	15	100 %
0,1	25	15	10	100 %
0,02	25	18	4	87,4 %
0,004	25	20	1	83,3 %
0,0008	25	6	2	29,1 %
0,00016	25	2	0	4,1 %
0,000032	25	1	0	0 %
Témoin				
Alcool seul	25	1	0	

TABLEAU XIV

ACTIVITE DU DIETHOXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE

SUR LES LARVES D'ANOPHELES STEPHENSI

Concentration en p.p.m.	Nombre de Larves	Nombre de larves moribondes	Nombre de larves mortes	% de mortalité
Di-éthoxy				
0,5	25	1	24	100 %
0,1	25	4	17	82,6 %
0,02	25	6	13	73,9 %
0,004	25	10	8	69,5 %
0,0008	25	5	3	26 %
0,00016	25	2	2	8,6 %
0,000032	25	1	1	0 %
Témoin				
Alcool seul	25	2	0	

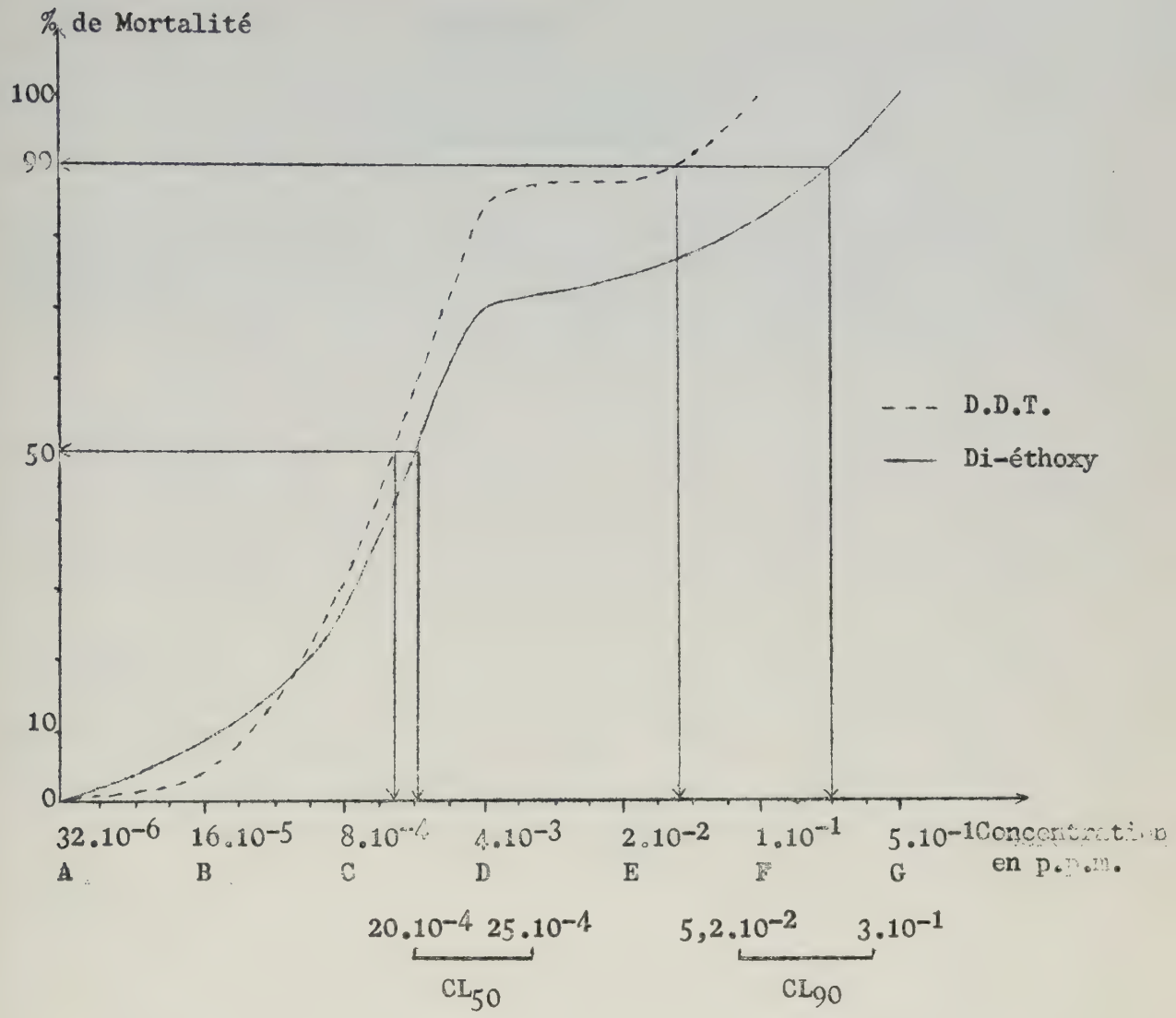


Figure 11 : Activités comparées du D.D.T. et du diéthoxy-diphényl-trichloréthane sur les larves d'Anopheles Stéphensi.

Entre A et B chaque intervalle équivaut à 32.10^{-6} p.p.m.
Entre B et C chaque intervalle équivaut à 16.10^{-5} p.p.m.
Entre C et D chaque intervalle équivaut à 8.10^{-4} p.p.m.
Entre D et E chaque intervalle équivaut à 4.10^{-3} p.p.m.
Entre E et F chaque intervalle équivaut à 2.10^{-2} p.p.m.
Entre F et G chaque intervalle équivaut à 1.10^{-1} p.p.m.

TABLEAU XV

ACTIVITE DES AUTRES DERIVES SUR LES LARVES D'ANOPHELES STEPHENSI

Concentration en p.p.m.	Nombre de Larves	Nombre de larves moribondes	Nombre de larves mortes	% de mortalité
Di-hydroxy				
4	25	4	1	20 %
Di-thymyl				
4	25	4	1	20 %
Iso-propyl				
4	25	7	2	36 %
Méta-crésol				
4	25	7	0	28 %
Témoin				
Alcool seul	25	0	0	

c) Interprétation : Les résultats obtenus (tableau XIII, XIV, XV) nous permettent de faire les remarques suivantes :

- les larves sont sensibles à tous les produits ;
- les dérivés chloré et éthoxylé se montrent extrêmement efficaces contre ces formes aquatiques. Les courbes de sensibilité montrent, par ailleurs, que les concentrations létales 50 sont très voisines ; cependant, nous notons une différence assez importante entre les deux CL_{90} puisque, pour obtenir ce pourcentage de mortalité, la dose de diéthoxy-diphényl-trichloréthane nécessaire est 6 fois supérieure à celle du D.D.T.

D.D.T.	CL_{50}	:	0,00208 p.p.m.
	CL_{90}	:	0,052 p.p.m.
Dérivé éthoxylé	CL_{50}	:	0,00256 p.p.m.
	CL_{90}	:	0,300 p.p.m.

A une concentration 8 fois supérieure à celle ayant donné 100 % de morts avec les dérivés précédents :

- le dihydroxy-diphényl-trichloréthane est très peu toxique ;
- les dérivés iso-propyl* et méta-crésol** sont peu actifs ;
- le dithymyl-trichloréthane, réunion des deux derniers substituants sur une même molécule, manifeste une activité amoindrie.

2°) Mélanges de deux produits

Les résultats précédemment obtenus nous amènent à penser qu'une association de deux substances pourrait manifester une synergie d'action. Puisque, à priori, nous n'avons pas la possibilité de prévoir si tel mélange est plus ou moins efficace que tel autre, nous étudions systématiquement certains mélanges possibles. Nous les divisons en deux groupes :

---

* Di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;

** Di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane .

celui du D.D.T. et celui du diéthoxy-diphényl-trichloréthane. Cela signifie que, dans chacun de ces groupes, l'un de ces dérivés est toujours présent et, de plus, employé à dose constante. Enfin, la concentration de chacun des deux composants est choisie de façon à ce que la même dose du produit pur n'entraine aucune mortalité ou, du moins, un taux très faible.

a) Préparation des dilutions : Nous prenons comme point de départ la solution-mère obtenue en dissolvant, en ballon jaugé, 25 mg de poudre dans 25 ml d'éthanol absolu : 1 ml dans 499 ml d'eau correspond à une concentration cristalline de 2 p.p.m. Toutes les autres solutions se préparent extemporanément.

α - dilutions du D.D.T. et du diéthoxy-diphényl-trichloréthane :

Nous avons déjà vu, lors de la préparation des dilutions à partir des produits purs, comment nous diluons jusqu'à 0,00016 p.p.m. dose choisie pour chacun de ces produits à l'état pur (témoin) et dans le mélange étudié.

β - dilutions des autres dérivés :

En mélangeant 0,5 ml de solution-mère à 0,5 ml d'alcool nous obtenons la dilution correspondant à 1 p.p.m., à partir de laquelle on prépare les témoins à 0,5 p.p.m., 0,2 p.p.m. et 0,1 p.p.m.

γ - composition des mélanges :

A l'aide d'une pipette de 2 ml graduée au 1/100 nous prélevons 2 ml de solution ; 1 ml de celle-ci est dilué dans 499 ml d'eau. Sa composition et sa concentration en produit actif figure au tableau XVI.

TABLEAU XVI

COMPOSITION ET CONCENTRATION DES MELANGES

Composition des Mélanges	Concentration Finale
0,2 ml de D.D.T. ou de diéthoxy* correspondant à 0,0008 p.p.m. 0,5 ml d'un autre dérivé correspondant à 2 p.p.m. 0,3 ml d'éthanol absolu	0,00016 p.p.m. de D.D.T. ou de diéthoxy* 1 p.p.m. d'un autre dérivé
0,2 ml de D.D.T. correspondant à 0,0008 p.p.m. 0,5 ml d'un autre dérivé correspondant à 1 p.p.m. 0,3 ml d'éthanol absolu	0,00016 p.p.m. de D.D.T. 0,5 p.p.m. d'un autre dérivé
0,2 ml de D.D.T. correspondant à 0,0008 p.p.m. 0,2 ml d'un autre dérivé correspondant à 1 p.p.m. 0,6 ml d'éthanol absolu	0,00016 p.p.m. de D.D.T. 0,2 p.p.m. d'un autre dérivé
0,2 ml de D.D.T. correspondant à 0,0008 p.p.m. 0,1 ml d'un autre dérivé correspondant à 1 p.p.m. 0,7 ml d'éthanol absolu	0,00016 p.p.m. de D.D.T. 0,1 p.p.m. d'un autre dérivé

* diéthoxy-diphényl-trichloréthane.

/

TABLEAU XVII

EFFICACITE DES MELANGES DU GROUPE
DU D.D.T. SUR LES LARVES D'ANOPHELES STEPHENSI

Formule	Conc. (p.p.m.)	Nbre Larves	Nombre de larves moribondes	mortes	% de mortalité corrigé*
Témoin	Alcool seul	25	1	0	
D.D.T.	16.10^{-5}	25	2	1	8,3 %
Iso-propyl (1)	1	25	3	2	16,6 %
Méta-crésol (2)	1	25	3	2	16,6 %
Di-hydroxy (3)	1	25	2	1	8,3 %
Di-thymyl (4)	1	25	2	4	20,8 %
D.D.T. + Iso-propyl (1)	16.10^{-5}-1	25	6	2	29,1 %
D.D.T. + Méta-crésol (2)	16.10^{-5}-1	25	3	1	12,5 %
D.D.T. + dihydroxy (3)	16.10^{-5}-1	25	5	19	95,8 %
D.D.T. + dithymyl (4)	16.10^{-5}-1	25	3	22	100 %

* chaque pourcentage tient compte de la mortalité spontanée telle qu'elle se manifeste dans les lots témoins ;

(1) di (ortho-isopropyl-hydroxy) di-phényl-trichloréthane ; (2) di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ; (3) dihydroxy-diphényl-trichloréthane ; (4) dithymyl-trichloréthane.

TABLEAU XVIII

EFFICACITE DES MELANGES DU GROUPE DU D.D.T. SUR LES LARVES D'ANOPHELES STEPHENSI

Formule	Conc. (p.p.m.)	Nbre Larves	Nombre de larves moribondes	mortes	% de mortalité
Témoin	Alcool seul	25	0	0	
D.D.T.	16.10^{-5}	25	1	0	4 %
Di-hydroxy*	0,5	25	1	1	8 %
	0,2	25	1	0	4 %
	0,1	25	2	0	8 %
Di-thymyl**	0,5	25	5	0	20 %
	0,2	25	3	1	16 %
	0,1	25	1	0	4 %
D.D.T. + dihydroxy*	16.10^{-5}-0,5	25	2	1	12 %
	16.10^{-5}-0,2	25	3	0	12 %
	16.10^{-5}-0,1	25	0	0	0 %
D.D.T. + dithymyl**	16.10^{-5}-0,5	25	10	0	40 %
	16.10^{-5}-0,2	25	3	0	12 %
	16.10^{-5}-0,1	25	2	0	8 %

* dihydroxy-diphényl-trichloréthane ;

** dithymyl-trichloréthane.

TABLEAU XIX

EFFICACITE DES MELANGES DU GROUPE DU
DI-ETHOXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE SUR LES LARVES
D'ANOPHELES STEPHENSI

Formule	Conc. (p.p.m.)	Nbre Larves	Nombre de larves moribondes	mortes	% de mortalité
Témoin	Alcool seul	25	0	0	
Di-éthoxy (1)	16.10^{-5}	25	1	1	20 %
D.D.T.	16.10^{-5}	25	1	0	10 %
Méta-crésol(2)	1	25	0	0	0 %
Isopropyl (3)	1	25	2	2	40 %
dihydroxy (4)	1	25	2	0	20 %
dithymyl (5)	1	25	2	0	20 %
diéthoxy (1) + D.D.T.	16.10^{-5} 16.10^{-5}	25	0	0	0 %
diéthoxy (1) + méta-crésol (2)	16.10^{-5}-1	25	2	1	30 %
diéthoxy (1) + isopropyl (3)	16.10^{-5}-1	25	5	1	60 %
diéthoxy (1) + dihydroxy (4)	16.10^{-5}-1	25	1	0	10 %
diéthoxy (1) + dithymyl (5)	16.10^{-5}-1	25	1	0	10 %

(1) diéthoxy-diphényl-trichloréthane ; (2) di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ; (3) di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ; (4) dihydroxy-diphényl-trichloréthane ; (5) dithymyl-trichloréthane.

b) Interprétation : Les mélanges renferment un composant, D.D.T. ou diéthoxy-diphényl-trichloréthane, extrêmement efficace contre les larves au 4ème stade d'Anopheles stephensi. Les courbes de sensibilité sont, par ailleurs, très voisines.

Pour détecter et évaluer un effet potentialisateur éventuel nous soumettons ces formes aquatiques à l'action de la plus petite dose n'entraînant aucune mortalité, ou un taux si faible qu'il peut être considéré comme négligeable.

Dans la série des mélanges contenant le D.D.T. nous notons (tableaux XVII, XVIII) l'intérêt suscité par deux d'entre eux :

- D.D.T. + dihydroxy-diphényl-trichloréthane,
- D.D.T. + dithymyl-trichloréthane

tuant respectivement 95,8 % et 100 % des Insectes. Compte-tenu de ces résultats, nous diluons les solutions de ces deux dérivés au 1/2, au 1/5 et au 1/10. Si l'on excepte le mélange D.D.T. à 16.10^{-5} p.p.m. + dithymyl-trichloréthane à 0,5 p.p.m., encore capable de tuer 40 % des larves, les autres concentrations sont tout à fait inactives.

Nous pensons qu'il s'agit là de mélanges d'action réellement synergique dont les concentrations optima se situent, chez cette souche sensible, à 16.10^{-5} p.p.m. pour le D.D.T. et à 1 p.p.m. pour le dérivé hydroxylé ou le dithymyl-trichloréthane. Cependant, ni l'analyse des résultats, ni nos recherches bibliographiques, ne nous permettent de penser que la toxicité renforcée est celle du D.D.T. ou bien celle de l'autre produit présent dans le mélange. Tout au plus, pouvons nous dire qu'ils agissent à des niveaux probablement différents dans la physiologie de l'Insecte.

Dans la série des mélanges contenant le diéthoxy-diphényl-trichloréthane (tableau XIX), nous croyons qu'il faut interpréter comme un accident le taux de mortalité présenté par le mélange diéthoxy-diphényl-trichloréthane + di ortho isopropyl-hydroxy-diphényl-trichloréthane car ce dernier à l'état pur manifeste, dans cette série expérimentale,

une toxicité sensiblement supérieure à celle précédemment mise en évidence.

Nous remarquons avec tout autant d'intérêt l'inefficacité totale de toutes les associations, y compris celle-ci : diéthoxy-diphényl-trichloréthane à 16.10^{-5} p.p.m.+ D.D.T. à 16.10^{-5} p.p.m. Ce fait s'explique d'autant plus difficilement que, nous le soulignons une fois encore, le dérivé éthoxylé employé pur s'affirme, pour ces larves, d'un pouvoir insecticide égal à celui du D.D.T. Cela nous permet de penser que le lieu d'action du diéthoxy-diphényl-trichloréthane diffère de celui du D.D.T.

IV

ETUDE SUR RHODNIUS PROLIXUS

Nous expérimentons sur Rhodnius prolixus (STAL) Insecte Hétéroptère, Réduvidé Triatominé, dont la souche nous a été fournie par le Laboratoire d'Immunologie et Biologie Parasitaire (Professeur PAUTRIZEL).

A - Conditions d'élevage

Quelques brefs rappels écologiques paraissent nécessaires afin de bien conduire l'élevage. Cet Hétéroptère est un insecte exotique, originaire d'Amérique du Sud où il transmet la maladie de CHAGAS, encore appelée Trypanosomose américaine. Espèce prédatrice de moeurs nocturnes, elle se nourrit exclusivement aux dépens des Vertébrés à sang chaud (30° C à 45° C).

L'élevage est conduit dans une étuve humidifiée, entre 25° C et 26° C, à l'obscurité, dans des bocaux de verre d'un litre, garnis de papier filtre plissé et fermés avec du tulle. La vitesse de croissance est subordonnée à la nature et à la qualité de la nourriture. Le Lapin est l'animal couramment utilisé : nous l'attachons sur le dos ; la région abdominale est ensuite rasée et le bocal contenant les Rhodnius est disposé à ce niveau, le tulle étant au contact de la peau. Dans cette position pendant 30 à 45 minutes, à l'obscurité, les Rhodnius piquent le lapin. Il semble, c'est une idée généralement admise, que le thermotropisme l'emporte sur tous les autres sens dans la recherche de l'hôte. Les tissus élastiques des larves permettent à leur abdomen de se gonfler, dans une proportion remarquable, par une simple distension ; chez les adultes, la rigidité des segments est plus grande : le connexivum, rebord latéral de l'abdomen, extrêmement extensible, facilite alors la réplétion. Le papier filtre doit être remplacé dès le lendemain du repas sanguin.

Régulièrement nourris, les Réduvidés ne tardent pas à pondre ; les oeufs, petits, roses et operculés, sont collés au support. La température du milieu ambiant règle à la fois la vitesse d'éclosion et la durée de chaque stade larvaire.

Enfin, il est préférable de séparer adultes, oeufs, et larves au même stade.

B - Principe

Ces Hétéroptères présentant une forte tolérance naturelle au D.D.T. nos études préliminaires ont permis la détermination :

- d'une part, de la période d'exposition nécessaire, ou temps pendant lequel les Insectes sont soumis à l'action de la substance. Il faut souligner qu'il s'agit ici d'un temps réel : les Rhodnius sont en contact permament avec chaque dérivé ;
- d'autre part, du degré de sensibilité qui revient à chercher, en tâtonnant, les deux doses extrêmes, l'une totalement inoffensive, l'autre tuant à 100 %.

Le processus (23) est ici nettement différent de ce que nous avons étudié jusqu'ici ; il présente deux particularités :

1°) Il ne s'agit plus d'un dépôt cristallin : les produits sont dissous dans l'huile et ce solvant demeure : nous le considérons comme le véhicule ;

2°) L'oléo-solution imprègne des papiers qui représentent le support.

Nous expérimentons soit sur des nymphes parvenues au dernier stade, soit sur des adultes dont la composition de la population, déterminée avant l'épreuve, est toujours la même. Les résultats des deux séries d'essais sont consignés séparément.

C - Méthode d'Etude

Dans chaque tube de verre de 2,7 cm de diamètre interne et d. 25 cm de hauteur (figure 12), nous introduisons un papier imprégné.

C'est un papier à chromatographie (WHATMANN n° 3) de 2,5 cm de large et de 15 cm de haut, offrant une surface de 37,5 cm^2, plié en forme de rigole dans le sens de la longueur.

Chaque papier reçoit 0,27 ml de la solution d'une substance dans l'huile d'olive neutralisée. Tous les produits, sauf le D.D.T. et le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane, sont insolubles ou peu solubles dans l'huile d'olive neutralisée. Pour remédier à cette insolubilité nous opérons de la façon suivante : peser 0,500 g de produit, le dissoudre dans 3,5 ml d'éther éthylique pur, puis ajouter aussitôt 10 ml d'huile. Agiter énergiquement, et laisser l'éther s'évaporer complétement, sauf pour le dihydroxy-diphényl-trichloréthane qui recristallise partiellement après l'évaporation de ce solvant. Pour ce dernier, il faut imprégner le papier immédiatement, et tenir compte de la quantité d'éther pour le volume à prélever. L'évaporation doit être totale avant d'introduire les Insectes. En procédant ainsi, le produit cristallise sur le papier, mais en cristaux beaucoup plus fins. L'huile servant de témoin est aussi traitée à l'éther, dans les mêmes proportions.

Nous préparons dans ces conditions un tube d'exposition pour chaque concentration et un tube témoin garni de papier simplement impré.. d'huile d'olive.

Dans chaque tube nous introduisons 10 Insectes : s'il s'agit d'adultes : 5 mâles et 5 femelles, s'il s'agit d'un stade immature : 10 nymphes.

Les larves diffèrent des adultes surtout par l'absence d'ailes et d'armature génitale ; il est aisé de les reconnaître. Elles subissent un certain nombre de mues : cinq en général. Avant les dernières,

des rudiments d'ailes deviennent visibles sous le tégument, et font saillie dans des fourreaux alaires. On donne souvent le nom de "nymphes" aux larves arrivées à ce dernier stade. Elles deviennent ensuite directement adultes après une dernière mue.

La différenciation sexuelle des imagos est un peu plus délicate ; elle nécessite un examen individuel. Chez les Reduviidae mâles (figure 13), on distingue sur la face dorsale de l'abdomen 6 segments dorsaux (tergites) allant de II à VII, le I et le VIII n'apparaissent pas ; sur la face ventrale, les segments (sternites) visibles sont au nombre de 8, II à IX. Le segment IX ou segment génital forme un pygophore et renferme le pénis ; à sa face dorsale s'ouvre l'anus. Chez les femelles (figure 14), l'aspect dorsal est à peu près identique, mais le tergite VII est échancré, suivi d'un tergite VIII très petit ; il en est de même sur la face ventrale où le sternite VII est creusé et suivi d'un sternite VIII divisé en deux lames. Quant aux sternites et tergites IX, X, XI ils forment le complexe génito-anal.

Une fois les lots formés, nous coiffons l'ouverture des tubes d'un capuchon de tulle ; nous les plaçons verticalement, à l'obscurité pendant toute la période d'exposition (5 jours). Les morts sont dénombrés au bout de ce temps. Les Insectes incapables de se mouvoir ou de s'accrocher au papier d'épreuve sont comptés comme morts.

Pour l'ensemble de nos essais les températures varient de 21° C à 24° C, et l'humidité de 54 % à 68 %.

D - Résultats

1°) Produits purs

Les diverses concentrations utilisées correspondent à une dilution de la solution-mère obtenue, comme il est dit dans la méthode d'étude, avec de l'huile traitée à l'éther. Pour 10 ml d'oléo-solution, les doses sont les suivantes :

500 mg 250 mg 100 mg 25 mg 10 mg

Fig. 12 : Tube d'épreuve

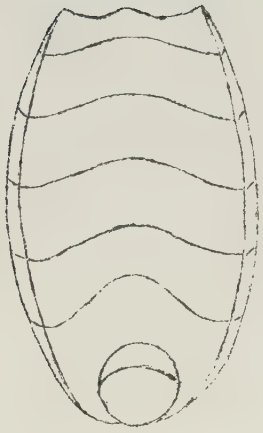


Fig. 13 : Abdomen de Reduviide mâle, face ventrale

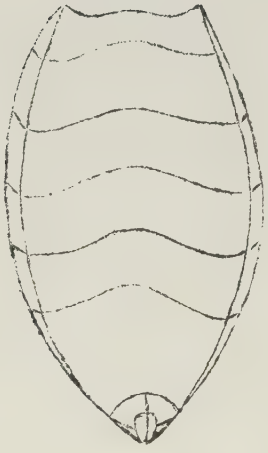


Fig. 14 : Abdomen de Reduviide femelle, face ventrale

Les quantités de produit contenues dans 0,27 ml de solution, adsorbées sur 37,5 cm^2 de papier, exprimées en mg par cm^2 sont respectivement de :

0,36	0,18	0,072	0,018	0,007

a) Tableaux :

TABLEAU XX

ACTIVITES DU D.D.T. ET DU DIETHOXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE SUR RHODNIUS PROLIXUS ADULTE

Concentration en mg/cm^2	Nombre d'adultes	Nombre de morts	% Mortalité
D.D.T.			
0,36	10	10	100 %
0,18	10	10	100 %
0,072	10	6	60 %
0,018	10	1	10 %
0,007	10	0	0 %
Diéthoxy-diphényl-trichloréthane			
0,36	10	10	100 %
0,18	10	10	100 %
0,072	10	5	50 %
0,018	10	3	30 %
0,007	10	0	0 %
Témoin			
Huile seule	10	0	

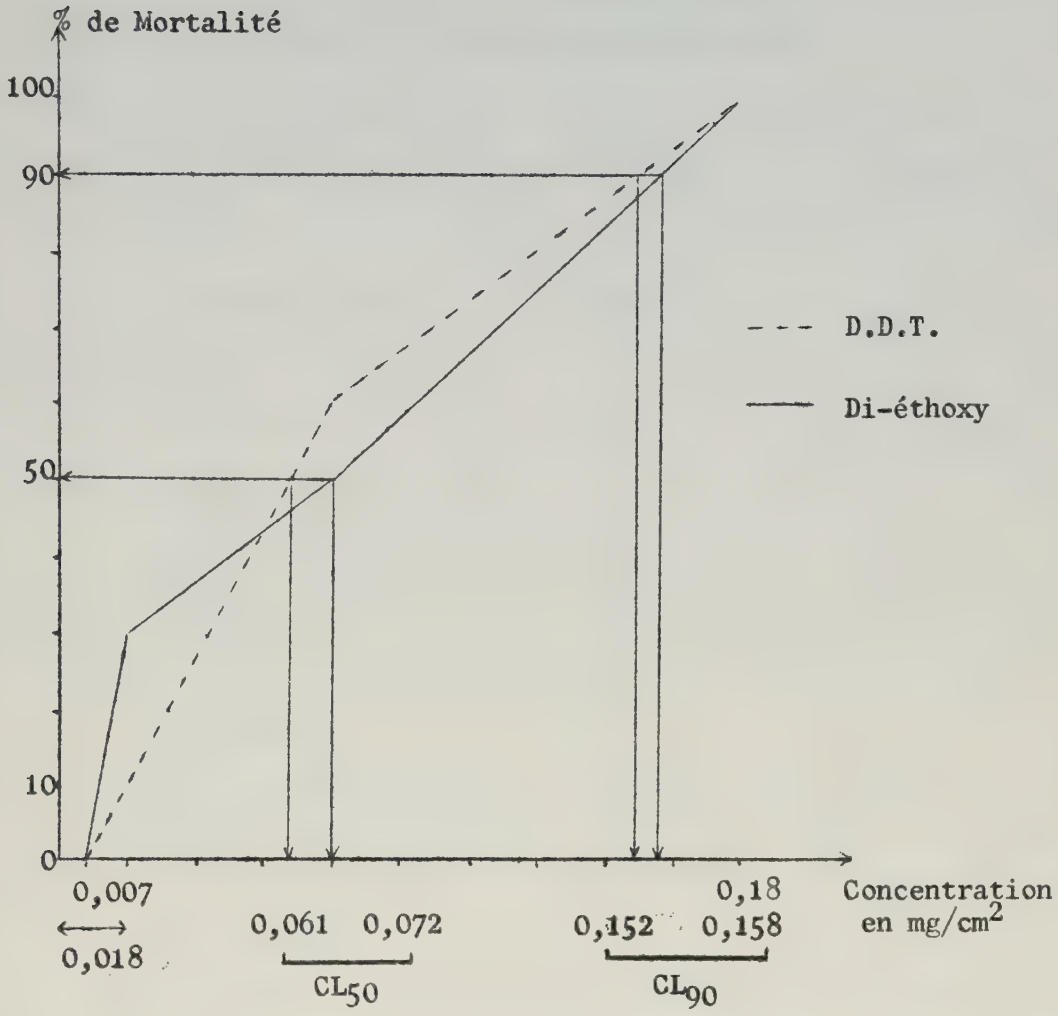


Figure 15 : Activités comparées du D.D.T. et du Diéthoxy-diphényl-trichloréthane sur Rhodnius prolixus adulte.

TABLEAU XXI

ACTIVITES DES AUTRES DERIVES

ETUDIES SUR RHODNIUS PROLIXUS ADULTE

Concentration en mg/cm^2	Nombre d'adultes	Nombre de morts	% de mortalité
Dihydroxy-diphényl-trichloréthane			
0,36	10	0	0 %
Dithymyl-trichloréthane			
0,36	10	0	0 %
Iso-propyl*			
0,36	10	0	0 %
Méta-crésol**			
0,36	10	0	0 %
Témoin			
Huile seule	10	0	

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane

** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane

TABLEAU XXII

ACTIVITES DE TOUTES LES SUBSTANCES SUR LES NYMPHES DE RHODNIUS PROLIXUS

Concentration en mg/cm^2	Nombre de nymphes	Nombre de morts	% de mortalité
D.D.T.			
0,36	10	0	0 %
0,18	10	0	0 %
Di-éthoxy-diphényl-trichloréthane			
0,36	10	1	10 %
0,18	10	0	0 %
Dihydroxy-diphényl-trichloréthane			
0,36	10	0	0 %
Dithymyl-trichloréthane			
0,36	10	0	0 %
Iso-propyl			
0,36	10	3	30 %
Méta-crésol			
0,36	10	3	30 %
Témoin			
Huile seule	10	0	

b) Interprétation : nos conditions expérimentales nous mênent aux conclusions suivantes :

1) Les Rhodnius sont diversement sensibles :
   - vis-à-vis de ces 6 produits ;
   - suivant leur stade d'évolution.

2) Le D.D.T. et le diéthoxy-diphényl-trichloréthane (tableau XX) sont très toxiques pour les adultes, leur toxicité étant d'ailleurs comparable :
   CL_{50} pour le D.D.T. : 0,061 mg/cm^2
   CL_{90} pour le D.D.T. : 0,152 mg/cm^2
   CL_{50} pour le diéthoxy : 0,072 mg/cm^2
   CL_{90} pour le diéthoxy : 0,158 mg/cm^2

Mais, à la concentration maximum, (les difficultés de solubilité, à la fois dans l'éther et dans l'huile ne nous ont pas permis d'aller au-delà de la concentration maximum de 500 mg dans 10 ml d'huile, soit 0,36 mg par cm^2), on ne note aucune activité (tableau XXI) :

- du di(ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
- du di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane
- du dithymyl-trichloréthane ;
- du dihydroxy-diphényl-trichloréthane.

3) Les nymphes au dernier stade (tableau XXII) ne sont pas tuées par :
   - le D.D.T. ;
   - le diéthoxy-diphényl-trichloréthane ;
   - le dihydroxy-diphényl-trichloréthane ;
   - le dithymyl-trichloréthane ;

   mais elles présentent une certaine sensibilité :
   - au di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
   - au di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane

4) Bien que ces deux dérivés manifestent une certaine activité sur les nymphes, la réunion de leurs groupements sur une même molécule forme un composé inactif : le dithymyl-trichloréthane.

2°) Mélange de deux produits

Compte-tenu des résultats précédents, et devant la différence très importante de réactivité entre les adultes et les nymphes soumis au D.D.T. et au diéthoxy-diphényl-trichloréthane d'une part, au di (ortho - isopropyl-hydroxy) - diphényl-trichloréthane d'autre part, nous avons été conduits à soumettre ces Insectes à un mélange de deux de ces produits.

Dans chacun de ces mélanges, l'une des substances est totalement inactive, l'autre très active ou peu active suivant le cas.

Nous travaillons sur les adultes et les nymphes. Les mélanges en expérimentation sont les mêmes :

(D.D.T.) - (Iso-propyl*)
(D.D.T.) - (Méta-crésol**)
(diéthoxy***) - (Iso-propyl*)
(diéthoxy***) - (Méta-crésol**)

Seules les concentrations diffèrent puisque ces deux stades de l'Insecte réagissent inégalement aux produits purs. Elles sont choisies de telle sorte qu'intervenant isolément elles n'entraînent que peu ou pas de mortalité.

---

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
*** diéthoxy-diphényl-trichloréthane.

a) Action sur les adultes : d'après les résultats enregistrés au tableau XXI, le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane et le di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane sont inefficaces à la concentration maximum de 0,36 mg/cm^2. Cependant, afin de rechercher un effet synergique éventuel nous avons retenu, pour chacun de ces deux dérivés, une dose 10 fois moindre : les quatre mélanges réalisés renferment donc 0,036 mg/cm^2 de chaque composant.

α. Tableaux :

TABLEAU XXIII

ACTIVITES DE QUATRE MELANGES POSSIBLES

SUR RHODNIUS PROLIXUS ADULTE

Concentration en mg/cm^2	Nombre d'Adultes	Nombre de morts	% de Mortalité
Témoin huile seule			
	10	0	0 %
Témoin Iso-propyl*			
0,036	10	0	0 %
Témoin Méta-crésol**			
0,036	10	0	0 %
(D.D.T.) - (Iso-propyl)*			
0,036 - 0,036	10	4	40 %
(D.D.T.) - (Méta-crésol)**			
0,036 - 0,036	10	2	20 %
(Diéthoxy)***- (Iso-propyl)*			
0,036 - 0,036	10	4	40 %
(Diéthoxy)***- (Méta-crésol)**			
0,036 - 0,036	10	3	30 %

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
*** diéthoxy-diphényl-trichloréthane.

TABLEAU XXIV

INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS

SUR RHODNIUS PROLIXUS ADULTE

% de Mortalité Prévisible	% de Mortalité obtenu
(Iso)* - (D.D.T.)	
20 % à 30 %	40 %
(Iso)* - (Diéthoxy)***	
30 % à 40 %	40 %
(Méta)** - (D.D.T.)	
20 % à 30 %	20 %
(Méta)** - (Diéthoxy)***	
30 % à 40 %	30 %

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;

** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;

*** diéthoxy-diphényl-trichloréthane.

β. Interprétation : les tableaux XXIII et XXIV montrent que les mélanges envisagés n'ont aucune valeur synergique. Le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane et le di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane employés chacun à 0,036 mg/cm^2 sont dépourvus de toute action insecticide, comme le montrent les tubes témoins.
Le faible pourcentage de mortalité enregistré lors des mélanges correspond à la toxicité propre soit au D.D.T., soit au diéthoxy-diphényl-trichloréthane, compte-tenu de la figure 15.

b) Action sur les nymphes : nous avons vu (tableau XXII) qu'aucun des produits que nous nous proposons d'associer, ne possède d'action toxique élevée sur les nymphes de Rhodnius prolixus, lorsqu'ils interviennent isolément. Dans le but de détecter une synergie possible, la concentration de chaque composant du mélange est abaissée à une valeur moitié de celle manifestant une très légère toxicité, soit 0,18 mg/cm^2.

α. Tableaux :

TABLEAU XXV

ACTIVITES DE QUATRE MELANGES POSSIBLES
SUR LES NYMPHES DE RHODNIUS PROLIXUS

Concentration en mg/cm^2	Nombre de Nymphes	Nombre de Morts	% de Mortalité
Témoin Huile seule			
	10	0	0 %
Témoin Iso-propyl*			
0,18	10	0	0 %
Témoin Méta-crésol**			
0,18	10	0	0 %
(D.D.T.) - (Iso-propyl)*			
0,18 - 0,18	10	2	20 %
(D.D.T.) - (Méta-crésol)**			
0,18 - 0,18	10	7	70 %
(Diéthoxy)*** - (Iso-propyl)*			
0,18 - 0,18	10	0	0 %
(Diéthoxy)*** - (Méta-crésol)**			
0,18 - 0,18	10	2	20 %

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
*** di-éthoxy-diphényl-trichloréthane.

TABLEAU XXVI

CONFIRMATION DE L'ACTIVITE PARTICULIERE AU MELANGE D.D.T. - META CRESOL* SUR LES NYMPHES DE RHODNIUS PROLIXUS

Concentration en mg/cm^2	Nombre de Nymphes	Nombre de morts	% de Mortalité
D.D.T.			
0,18	10	1	10 %
0,36	10	1	10 %
Méta-crésol*			
0,18	10	0	0 %
0,36	10	0	0 %
(D.D.T.) - (Méta-crésol)*			
0,18 - 0,18	20	9	45 %
Témoin			
Huile seule	10	0	

* di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane.

β. Interprétation : sur les nymphes gorgées, si le mélange [di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane] + [diéthoxy-diphényl-trichloréthane] n'ajoute rien à l'activité des produits purs, on peut remarquer une certaine activité des mélanges suivants (tableau XXV):

- (D.D.T.) + di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane : 20 % de mortalité ;
- diéthoxy-diphényl-trichloréthane + di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane, tuant aussi 20 % des Insectes.

Cependant, ce qui paraît surtout important et doit être retenu, c'est le mélange (D.D.T.) + di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane . Comparons les résultats :

- chacun des 2 produits employé seul à la dose de 0,18 mg/cm^2 n'engendre aucune mortalité ou, du moins, un taux négligeable ;
- le mélange, à la même concentration pour les deux dérivés : 0,18 mg/cm^2, atteint un pourcentage de mortalité de 70 % au premier essai, de 45 % à un deuxième essai.

On peut donc conclure que l'association D.D.T. + di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane exerce, sur les nymphes de Rhodnius prolixus gorgées, une véritable action synergique, sans que nous puissions toutefois préciser laquelle des deux substances valorise l'autre.

TABLEAU XXVII

INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS SUR LES NYMPHES DE RHODNIUS PROLIXUS

% de mortalité prévisible	% de mortalité obtenu
(Iso)*- (D.D.T.)	
0 %	20 %
(Iso)* - (Diéthoxy)***	
0 %	0 %
(Méta)** - (D.D.T.)	
0 %	70 % et 45 %
(Méta)** - (Diéthoxy)***	
0 %	20 %

* di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;

** di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;

*** diéthoxy-diphényl-trichloréthane.

V

ETUDE SUR BLATELLA GERMANICA

Nous expérimentons sur des adultes de Blatella germanica (L.) Insecte Orthoptère, Blattidé.

A - Conditions d'élevage

Quelques traits caractéristiques de leur biologie nous aiguillent en ce domaine. Il s'agit d'une espèce domestique thermophile, recherchant les lieux humides, omnivore, de moeurs nocturnes.

Nous les élevons dans des cristallisoirs dont le fond est recouvert d'1 cm de sciure. Une mince pellicule d'un mélange homogène de vaseline et d'huile de vaseline à parties égales enduit le bord interne des cuves, évitant ainsi la fuite des Insectes. Des aliments pour Souris assurent leur nourriture ; un coton imbibé en permanence maintient l'humidité. Les récipients sont recouverts de tulle de nylon. Une température de 25° C - 26° C, en étuve obscure munie d'un dispositif à évaporation d'eau, permet une reproduction légèrement accélérée.

La ponte se fait dans une capsule cornée ou oothéque qui reste engagée, pendant un mois environ, à l'extrémité abdominale de la femelle. Puis l'Insecte l'abandonne. Très peu de temps après, les jeunes Blattes sortent le long d'une ligne de suture. Elles différent alors des adultes par l'absence d'ailes. Leur évolution jusqu'à l'imago demande en moyenne 6 mois et comporte un nombre de mues assez considérable : 6 ou 7 au moins. Le mode de vie est exactement le même chez les jeunes. On peut sans inconvénient les laisser réunis, mais en petites colonies.

Nous poursuivons l'élevage jusqu'à la 3ème génération. Immédiatement après la dernière mue, nous séparons les sexes. La différenciation

est aisée : le mâle présente une extrémité abdominale nettement effilé, l'oviscapte de la femelle lui donne une forme arrondie.

Cet élevage s'est montré particulièrement délicat. Nous n'avons finalement disposé que d'un nombre restreint d'Insectes ; cela explique le peu d'individus entrant dans chaque lot.

B - Principe

Les substances sont dissoutes dans un liquide organique volatil qui, après évaporation, laisse sur la paroi interne des récipients d'épreuves une pellicule microcristalline aussi uniforme que possible. Nous soumettons des lots de Blattes à son action (24). Si les concentrations varient, le temps de contact est constant et réel, les Insectes ne volant pas. Ce temps écoulé, nous enregistrons la mortalité.

C - Méthode d'Etude

1°) Matériel

Les essais s'effectuent dans des tubes de verre de 25 cm de long et 2,7 cm de diamètre interne, à fond hémisphèrique. Le tout offre une surface d'environ 214 cm^2.

2°) Technique

Nous préparons une solution-mère en dissolvant, dans un ballon jaugé, 250 mg de produit dans 25 ml d'acétone pure. Les concentrations réalisées et le volume de solution introduit dans les tubes, à l'aide d'une pipette de 2 ml graduée au 1/100, sont :

Concentration	750 mg/m^2	500 mg/m^2	250 mg/m^2
Volume	1,605 ml	1,070 ml	0,535 ml

Pour ces deux dernières concentrations nous complétons le volume indiqué à 1,605 ml avec le solvant pur ; le tube témoin reçoit lui-même 1,605 ml de ce solvant.

Nous évaporons l'acétone par rotation manuelle du tube en

position inclinée. Toute odeur doit disparaître avant d'introduire les Insectes.

Les Blattes sont préalablement légèrement anesthésiées par refroidissement (30 minutes au réfrigérateur à + 4° C), puis réparties par lots de 5 : 3 femelles et 2 mâles dans un premier essai, 2 femelles et 3 mâles dans un deuxième essai.

Les aliments sont au fond des tubes, et ceux-ci sont fermés avec un capuchon de tulle. Un tampon de coton imbibé d'eau est appliqué contre le tulle, du côté externe, et maintenu humide pendant les 5 jours de l'épreuve. Les récipients sont en position horizontale et exposés à la lumière du jour.

Les 120 heures écoulées, nous comptons les morts. Pour l'ensemble de ces essais, la température varie de 24° C à 25° C, et l'humidité de 54 % à 67 %.

D - Résultats

Toute Blatte incapable de se mouvoir est considérée comme morte.

1°) Tableaux :

TABLEAU XXVIII

ACTIVITE DU D.D.T. ET DU DIETHOXY-DIPHENYL-TRICHLORETHANE SUR BLATELLA GERMANICA

Concentration en mg/m^2	Nombre de Blattes	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
D.D.T.					
750	5	2	3	5	100 %
500	5	2	3	5	100 %
250	5	2	3	5	100 %
750	5	3	2	5	100 %
500	5	3	2	5	100 %
250	5	3	2	5	100 %
Di-éthoxy-diphényl-trichloréthane					
750	5	2	3	3	60 %
500	5	2	3	0	0 %
250	5	2	3	0	0 %
750	5	3	2	1	20 %
500	5	3	2	0	0 %
250	5	3	2	0	0 %
Témoin					
Acétone seule	5	2	3	0	
Acétone seule	5	3	2	0	

TABLEAU XXIX

ACTIVITE DES AUTRES DERIVES ETUDIES

SUR BLATELLA GERMANICA

Concentration en mg/m^2	Nombre de Blattes	Population ♂	Population ♀	Nombre de morts	% de mortalité
Di-hydroxy-diphényl-trichloréthane					
750	5	2	3	0	0 %
750	5	3	2	0	0 %
Di (ortho-isopropyl hydroxy) diphényl-trichloréthane					
750	5	2	3	0	0 %
750	5	3	2	0	0 %
Di (méta-méthyl-hydroxy) - diphényl-trichloréthane					
750	5	2	3	0	0 %
750	5	3	2	0	0 %
Dithymyl-trichloréthane					
750	5	2	3	0	0 %
750	5	3	2	0	0 %
Témoin					
Acétone seule	5	2	3	0	
Acétone seule	5	3	2	0	

2°) Interprétation : le D.D.T. mis à part, aucun de ces produits (tableau XXIX) n'est efficace contre les Blattes, dont il se peut que la souche ait été mise en présence d'insecticide avant la capture. Il faut pourtant noter une mortalité moyenne de 40 % obtenue avec le diéthoxy-diphényl-trichloréthane, (tableau XXVIII), mais à une concentration très élevée.

TROISIEME PARTIE

D I S C U S S I O N

Dans cette dernière partie nous allons essayer d'interpréter les résultats que nous avons obtenus. On sait que les molécules étudiées diffèrent entre elles par la nature et le nombre des groupements fixés sur chaque noyau benzénique du diphényl-trichloréthane. L'influence que peuvent avoir ces substituants sur le pouvoir insecticide, l'activité anthelminthique et la toxicité à l'égard de la Souris, fait l'objet de ce chapitre.

I

ETUDE COMPAREE ET SYNTHESE DES RESULTATS

1°) Pouvoir insecticide :

Les résultats groupés dans le tableau XXX mettent en évidence la forte variation d'activité entre le D.D.T., pris comme élément de référence, le diéthoxy-diphényl-trichloréthane, et les quatre autres dérivés de substitution du diphényl-trichloréthane.

Ainsi, dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés, la présence des radicaux chlore ou éthoxyl, en para sur les noyaux aromatiques confère à la molécule du dithymyl-trichloréthane des activités du même ordre qui se traduisent par une toxicité élevée à l'égard de Calliphora erythrocephala, Anopheles stephensi (adultes et larves), et Rhodnius prolixus (adultes) mais négligeable vis-à-vis des nymphes de cet Hétéroptère. Par contre, seul le chlore en para semble être indispensable à la manifestation de la toxicité à l'égard de Blatella germanica.

La libération des deux fonctions phénol précédemment bloquées par éthylation annule toute activité.

TABLEAU XXX

INFLUENCE DES SUBSTITUANTS SUR LE POUVOIR INSECTICIDE

Substituants	Calliphora	Anopheles stephensi		Rhodnius prolixus		Blatella
		Adultes (a)	larves (b)	Adultes (c)	nymphes -	(b)
- Cl (D.D.T.)	4	9/10.000	2,08	0,061	Inactif	Très < 250
- OC_2H_5	2,5	47/10.000	2,56	0,072	Très peu actif	Peu actif
- OH (1) - $CH(CH_3)_2$ (2) - CH_3 (3)	Inactif	3,5/10.000	Très peu actif	Inactif	Inactif	Inactif
- OH (1) - CH_3 (3)	Inactif	Très peu actif	Peu actif	Inactif	Peu actif	Inactif
- OH (1) - $CH(CH_3)_2$ (2)	Inactif	Inactif	Peu actif	Inactif	Peu actif	Inactif
- OH	Inactif	Très peu actif	Très peu actif	Inactif	Inactif	Inactif

(a) CL_{50} en mg/m^2

(b) CL_{50} en parties pour milliard

(c) CL_{50} en mg/cm^2

(1), (2), (3) : positions des substituants sur la molécule - type.

L'introduction d'un méthyl en méta par rapport à l'hydroxyl, ou d'un isopropyl en ortho également par rapport à l'hydroxyl, conduit à deux molécules d'activité comparable : celle-ci s'exerce faiblement, et seulement sur les larves d'Anopheles stephensi.et les nymphes de Rhodnius prolixus, donc sur des formes immatures.

Le dérivé qui résulte de la coexistence des groupements méthyl et isopropyl, respectivement en méta et en ortho par rapport à l'hydroxyl (dithymyl-trichloréthane) voit son efficacité considérablement accrue, mais seulement à l'égard d'Anopheles stephensi adulte. Par conséquent, la présence simultanée des deux substituants intensifie, chez cet Insecte, l'activité manifestée en leur absence, et la porte à un niveau très voisin de celui atteint par le D.D.T. chez le même Insecte.

Parmi les mélanges étudiés, le tableau XXXI montre des résultats très divers selon l'association envisagée, et selon l'Insecte soumis à l'essai. Le D.D.T. et le diéthoxy-diphényl-trichloréthane possédant une action propre très intense, nous associons chacun d'eux, à dose infime, à des dérivés pratiquement inactifs.

Parmi les différentes associations expérimentées, les seules à manifester une synergie sont celles renfermant du D.D.T. : ainsi les larves d'Anopheles stephensi sont plus sensibles à une concentration en D.D.T. normalement inactive lorsque celui-ci agit en présence du composé hydroxylé ou du dithymyl-trichloréthane, eux-mêmes intervenant à des doses normalement inefficaces. Le comportement des nymphes de Rhodnius prolixus est similaire à l'égard du mélange D.D.T. - dérivé méta-méthyl-hydroxy.

Paradoxalement l'action simultanée des deux molécules les plus actives ne détermine pas un renforcement d'activité.

2°) Pouvoir anthelminthique

Nous avons signalé précédemment que BAILENGER et Coll. ont expérimenté ces molécules sur un Nématode (Syphacia obvelata) et sur un Cestode (Hymenolepis nana). Il nous paraît opportun de rappeler ici les

TABLEAU XXXI

INFLUENCE DES ASSOCIATIONS SUR LE POUVOIR INSECTICIDE

Mélanges	Anopheles Stephensi (Larves)	Rhodnius prolixus (Adultes)	Rhodnius prolixus (Nymphes)
1° - Cl (D.D.T.) 2° - OH	Très active		
1° - Cl (D.D.T.) 2° - OH (1) - CH(CH3)2 (2) - CH3 (3)	Très active		
1° - Cl (D.D.T.) 2° - OH (1) - CH(CH3)2 (2)	Inactive	Inactive	Inactive
1° - Cl (D.D.T.) 2° - OH (1) - CH3 (3)	Inactive	Inactive	Active
1° - OC_2H_5 2° - Cl (D.D.T.)	Inactive		
1° - OC_2H_5 2° - OH	Inactive		
1° - OC_2H_5 2° - OH (1) - CH(CH3)2 (2) - CH3 (3)	Inactive		
1° - OC_2H_5 2° - OH (1) - CH(CH3)2 (2)	Inactive	Inactive	Inactive
1° - OC_2H_5 2° - OH (1) - CH3 (3)	Inactive	Inactive	Inactive

(1), (2), (3) : positions des substituants sur la molécule - type.

conclusions de leurs études concernant l'influence des divers substituants fixés sur la partie aromatique:

1 - la présence de chlore en para est sans intérêt à l'égard des parasites envisagés ;
2 - l'action du groupement hydroxyl est marquée pour Syphacia ;
3 - l'éthylation de la fonction hydroxyl détruit l'activité précédente vis-à-vis de Syphacia ;
4 - la présence d'un groupement méthyl en méta, ou isopropyl en ortho, par rapport à l'hydroxyl, augmente le pouvoir anthelminthique et conduit à des produits d'efficacité comparable sur le Nématode ;
5 - le dithymyl-trichloréthane se montre plus actif, puisqu'il est capable de déparasiter les Souris de la totalité de leurs Nématodes ;
6 - A l'opposé de Syphacia, qui est plus ou moins facilement atteint par toutes les substances étudiées, exception faite du D.D.T. et du diéthoxy-diphényl-trichloréthane, Hymenolepis nana ne réagit qu'au di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane, vis-à-vis duquel ce Cestode présente une sensibilité comparable à celle manifestée par le Nématode.

3°) Toxicité

Au cours de l'étude bibliographique de ces dérivés du diphényl-trichloréthane, nous avons envisagé leur toxicité à l'égard de la Souris. C'est ainsi que BAILENGER et coll. ont tiré les conclusions suivantes :

1 - le chlore fixé en para sur les noyaux aromatiques confère à la molécule de D.D.T. une toxicité maximum ;
2 - le remplacement du chlore en para par une fonction phénol la diminue très sensiblement ;
3 - si les groupements hydroxyl en para sont bloqués par éthylation, le dérivé obtenu est pratiquement atoxique ;
4 - l'introduction d'un méthyl, en méta par rapport à l'hydroxyl, accroît la toxicité ;

5 - l'introduction d'un isopropyl, en ortho par rapport à l'hydroxyl, élève la toxicité, mais à un degré moindre que la substitution précédente ;

6 - la présence, dans la même molécule, des trois groupements hydroxyl, méthyl et isopropyl, dans des positions où leurs influences sont connues, conduit à une molécule (dithymyl-trichloréthane) d'une toxicité pratiquement négligeable.

4°) Synthèse des résultats obtenus

En présentant sous forme de graphiques (figures 16, 17, 18, 19) tous les résultats précédemment analysés, nous allons comparer l'influence des substituants sur les activités insecticide et anthelminthique, ainsi que sur la toxicité à l'égard de la Souris.

L'observation de ces graphiques ne révèle pas de rapport évident entre la toxicité vis-à-vis de la Souris, l'activité contre les Cestodes et le pouvoir insecticide. Mais toutefois, il peut être intéressant de souligner une opposition entre ce dernier et l'influence sur les Nématodes : les composés nocifs pour les Insectes (D.D.T. et dérivé éthoxylé) sont inactifs sur Syphacia, et inversement les substances actives sur ce ver ne sont pratiquement pas insecticides ; il s'agit de celles renfermant un hydroxyle seul ou associé à d'autres substituants.

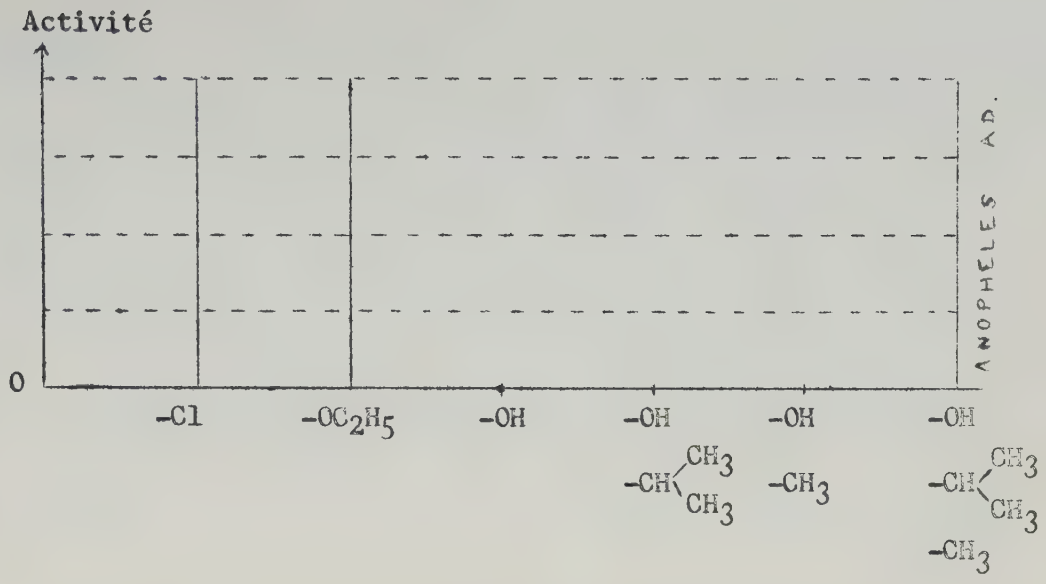


Figure 16 : Influence des substituants sur le pouvoir insecticide.

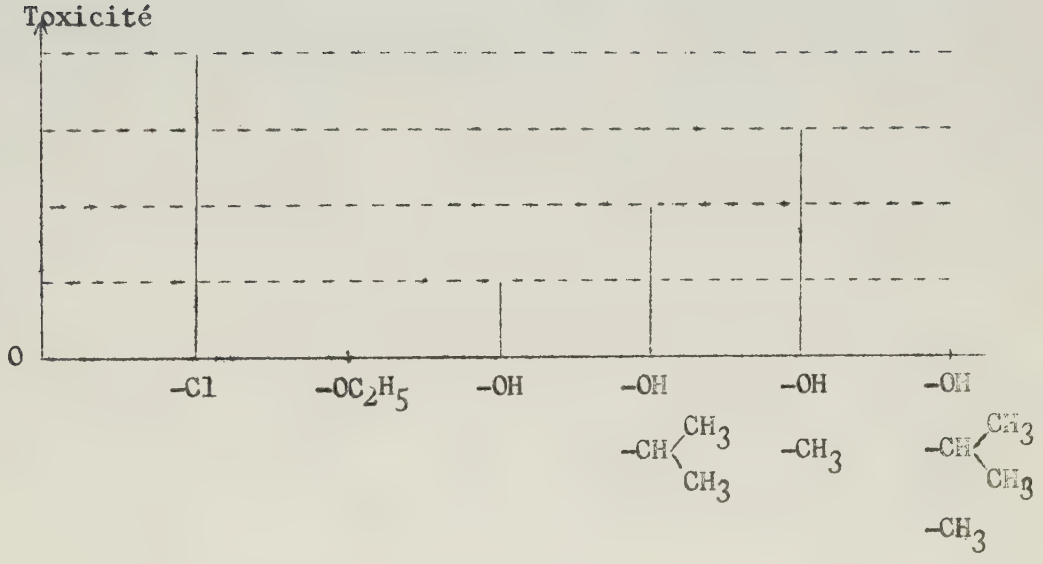


Figure 17 : Influence des substituants sur la toxicité à l'égard de la Souris.

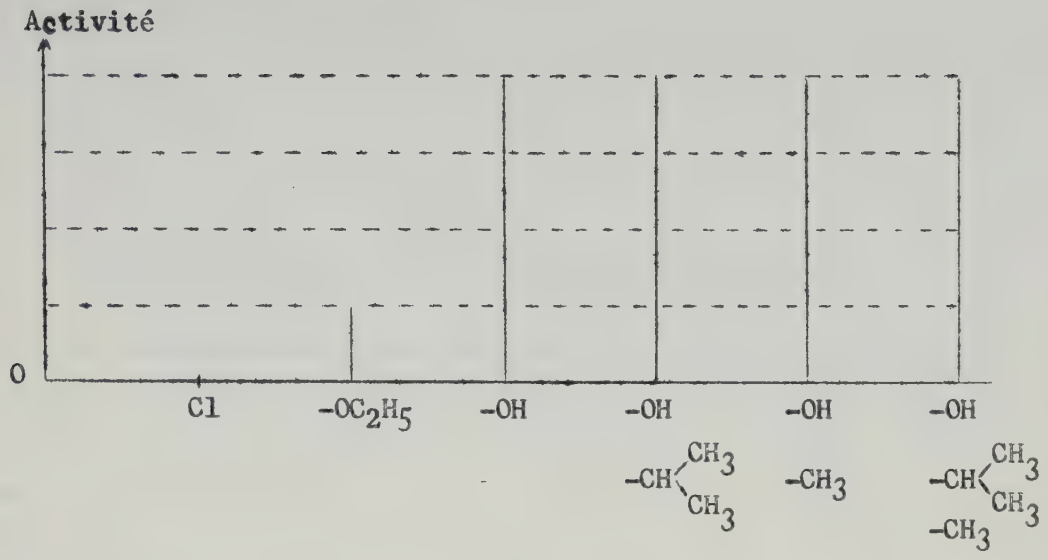


Figure 18 : Influence des substituants sur l'activité anthelminthique (Nématode)

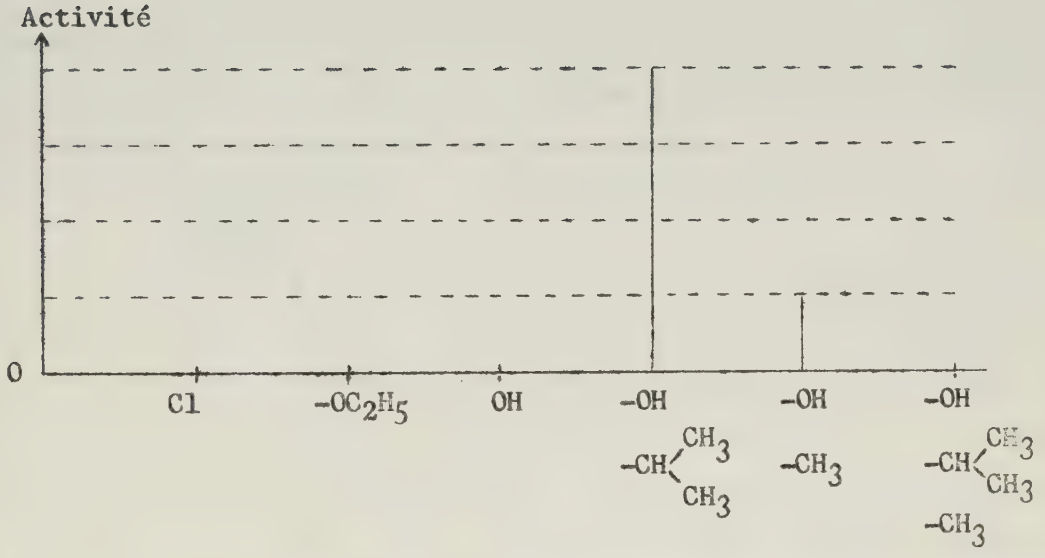


Figure 19 : Influence des substituants sur l'activité anthelminthique (Cestode)

II

RAPPORTS ENTRE ACTIVITE ET STRUCTURE CUTICULAIRE

Pour expliquer une telle sélectivité de la part de molécules montrant une grande parenté structurale on peut penser, entre autres, à l'intervention de caractéristiques anatomiques ou physiologiques des Insectes et des Helminthes. Parmi elles, nous porterons une attention plus particulière au revêtement cuticulaire, qui conditionne grandement la pénétration du produit dans l'organisme.

A - CAS DES INSECTES

1°) Structure de la cuticule

Les Insectes sont des Arthropodes ; on sait que ceux-ci sont essentiellement caractérisés par la présence d'une cuticule sécrétée par l'épithélium (11). A la suite des travaux de WIGGLESWORTH et RICHARDS (29), il est possible de distinguer plusieurs couches :

a) l'épicuticule, la plus externe, elle-même divisée le plus souvent en trois plans :

- à l'extérieur, le cément semble consister en une protéine tannée par des quinones et combinée avec des lipides. Sa fonction probable est de protéger la cire;
- au centre la cire, faite d'un mélange de paraffines en C_{27} et C_{31}, ainsi que d'esters d'alcools supérieurs et d'acides non saturés en C_{26} ou C_{30}. Les chaînes hydrocarbonées sont dirigées vers l'extérieur, les groupes hydroxyles et carbonyles vers l'intérieur, liés aux protéines. Elle est responsable de la rétention d'eau;

- une couche interne, mince, de lipoproteines tannées dont les lipides contiennent des stérols : la cuticuline.

Cependant, chez Rhodnius une couche de polyphénols vient s'intercaler entre la cire et la cuticuline ; chez la Blatte on trouve seulement la cire et la cuticuline.

L'épicuticule joue un rôle très important dans l'imperméabilité à l'eau, non seulement à cause du tannage et de la condensation des protéines mais aussi, et surtout, par la cire.

b) L'exocuticule résulte du tannage d'un proteine soluble et molle par des quinones formées par oxydation de dihydroxyphénols. Ces protéines tannées sont une matière insoluble, dure, sombre, appelée sclérotine.

c) L'endocuticule est constituée de chitine, acétate d'un polysaccharide dont l'élément essentiel est la glucosamine ; CH_2 OH - (CH OH)$_3$ - CH (NH_2) - COH (glucosamine).
Elle est intimement associée à une protéine tannée hydrosoluble : l'arthropodine (FRAENKEL et RUDALL, 1947) voisine de la séricine.
Chitine et arthropodine sont peut être combinés pour former une mucoprotéine.
La chitine ne constitue qu'une partie de la cuticule des Insectes, mais elle en est le constituant caractéristique. On admet généralement qu'elle se présente sous forme de micelles consistant en un faisceau de polymères à longues chaines maintenues ensemble par des valences secondaires.

N'oublions ni les nombreux poils, écailles, organes sensoriels insérés sur la cuticule, ni les canalicules poreux : fines formations cheminant verticalement à partir des cellules hypodermiques à travers l'endocuticule, l'exocuticule et quelquefois une partie de l'épicuticule.

On ignore leur importance et leur fonction est mal connue ; ils renferment le plus souvent des éléments lipoïdes.

2°) Pénétration et mode d'action des Insecticides

Pour expliquer l'efficacité variable des substances qui font l'objet de ce travail il existe de nombreuses théories (8).

On sait que ces composés sont en général solubles dans les corps gras. Pour BUSVINE (1945), la toxicité est fonction de cette propriété : qu'elle soit attribuée au groupement - $C \equiv Cl_3$ (LAUGER, 1944) ou aux chaînons chlorobenzéniques (MARTIN, 1944), la liposolubilité entraîne le franchissement de l'épicuticule.

De cette façon, l'insecticide vient s'accumuler à l'interphase entre l'épicuticule et l'exocuticule hydrophile. Sa concentration en ce point facilite ensuite sa diffusion dans les couches immédiatement sous-jacentes ; la solubilité dans l'eau doit donc être suffisante pour qu'une dose active puisse passer de l'épicuticule dans la cavité générale.

Cependant, le D.D.T. a peut-être un mode de pénétration particulier : la chitine possède une grande affinité pour le D.D.T. ; celui-ci s'adsorberait sur les micelles de chitine de l'endocuticule. Le D.D.T. pénètre donc à la fois grâce à sa solubilité dans les lipides de l'épicuticule, mais aussi à la suite de son adsorption sur les micelles de chitine ; il migre ensuite entre les espaces intermicellaires. On pense aussi que cette adsorption n'est pas due à une simple rétention mécanique, mais qu'elle s'accompagne de phénomènes de nature chimique ou physico-chimique, et en tout cas spécifiques, car diverses substances, dont certaines comme la cellulose, ont une structure très voisine de la chitine et n'adsorbent pas pour cela le D.D.T. Il y a donc corrélation entre la possession d'une cuticule chitineuse et la sensibilité au D.D.T. (LORD, 1948 ; RAJINDAR PAL, 1954). FISHER (1952) affirme même que cette pénétration à travers la cuticule est un phénomène indispensable lié à la manifestation de la toxicité.

Les premiers effets toxiques n'apparaissent que lorsque le système nerveux est touché : les insecticides de contact affecteraient la membrane protéique entourant le nerf. Ils s'insinueraient entre les molécules orientées de lipoprotéines du neurone et réduiraient ainsi sa perméabilité aux ions calcium, magnésium et potassium. Ces possibilités de pénétration (WELSH et GORDON, 1947) seraient excessivement variables suivant l'isomérie, c'est-à-dire la position des radicaux, qui modifient la forme de la molécule et son orientation par leur action attractive ou répulsive par rapport aux protéines. Une modification des lipoïdes ou des lipoprotéines au niveau des terminaisons nerveuses est considérée comme étant l'une des causes de la chimio-résistance.

Les insecticides synthétiques de contact agissent, au moins partiellement, en bloquant des systèmes enzymatiques. LLOYD et SOLLY pensent que l'action insecticide de contact provient de l'interaction d'un composé chimique avec un composant normal du métabolisme dont il perturbe le fonctionnement. Ce composant est en général un enzyme ou un système enzymatique : le pouvoir insecticide résulterait ainsi d'une combinaison plus ou moins stable avec un enzyme.

Pour comparer la toxicité du D.D.T. à celle de produits analogues, RIEMSCHNEIDER (1954) s'adresse à la configuration stéréochimique plutôt qu'à la constitution chimique. Le facteur le plus important serait le degré de rotation libre des noyaux benzéniques et du groupement - $C \equiv Cl_3$. Cet auteur distingue :

- la rotation totalement libre : les noyaux et le groupement peuvent tourner librement les uns par rapport aux autres ;
- la rotation partiellement libre, due à l'encombrement plus ou moins grand de certains substituants fixés sur les noyaux ;
- la rotation entravée : les substituants occupent dans l'espace un volume important et suppriment la rotation des noyaux.

Il y aurait ainsi parallélisme entre la rotation libre et l'efficacité insecticide. De même, il y aurait une relation entre l'efficacité relative des différents analogues du D.D.T. substitués en p,p' et les effets polaires de ces substituants (19).

3°) Conclusions

On voit que, pour atteindre les cellules hypodermiques des Insectes, les substances étudiées doivent traverser la cuticule. WEBB et GREEN (1945) (28) la considérent comme un système simple à deux phases : l'une externe, lipophile, correspondant à l'épicuticule, l'autre interne, hydrophile, correspondant à l'exocuticule et à l'endocuticule. Une fois franchie la barrière cuticulaire, le poison est véhiculé par l'hémolymphe (LEROUX et MORRISSON, 1954) jusqu'aux différentes parties du corps.

Cette conception de la structure cuticulaire des Insectes nous paraît être une simplification exagérée de phénomènes très complexes. Bien que de nombreuses études aient été faites à ce sujet, le comportement physiologique de la cuticule des Insectes ne semble pas être complétement élucidé. Un grand nombre de théories essayent d'expliquer le mécanisme d'action des Insecticides de contact. Si toutes tendent vers ce but, aucune n'apparait pourtant entièrement satisfaisante. Les expérimentateurs sont par conséquent contraints à une recherche systématique.

B - CAS DES VERS

1°) Structure de la cuticule des Nématodes

Ce sont les observations sur Ascaris lumbricoïdes qui servent de base à l'interprétation de la structure de la cuticule (13, 15, 27). Celle-ci semble formée de couches comprenant cortex, matrice, fibres, dont il est parfois difficile de déterminer les limites.

1 - Couche corticale externe contenant des lipides, des protéines tannées par des polyphénols - quinones, une polyphénol-oxydase, des phospholipides, pas de kératine ;

2 - Couche corticale interne avec de nombreux enzymes, en particulier des phosphatases acides, de l'acide ascorbique, ARN, ATP, peut être du collagène ?

3 - Couche fibrillaire résultant de la condensation de protéines fibreuses ;

4 - Couche de fond, ou matrice, qui serait une protéine fibrillaire sulfurée ;

5 - Couche limitante ;

6 - 7 - 8 - Couches successives de fibres obliques d'une substance conjonctive très dense ;

9 - Lamelle basale.

Les couches autres que le cortex renferment beaucoup d'acides aminés et du collagène.

La cuticule couvre entièrement la surface externe et borde aussi la cavité buccale, l'oesophage, le rectum, le cloaque, le vagin et les pores d'excrétion. Il y a des différences de structure et de composition entre la cuticule externe et la cuticule qui borde ces orifices et ces conduits, mais on sait peu de choses sur ces différences (CHITWOOD et CHITWOOD, 1950).

2°) Structure de la "cuticule" des Cestodes

Des études au microscope électronique permettent de définir trois couches dans la "cuticule" (12, 15, 27) :

1- La couche externe, rarement lisse, présente des villosités probablement destinées à augmenter considérablement la surface d'absorption ;

2- Au-dessous, reposant sur une membrane basale, se trouve une couche qui renferme des granulations fortement chromophiles, ainsi que de nombreuses vacuoles et vésicules, des mitochondries en abondance ;

3- Les cellules sous-cuticulaires situées dans le parenchyme sont généralement considérées comme formant la couche profonde de cette cuticule. Par de fins prolongements, ces cellules ponctuent la membrane basale, et entrent ainsi en communication avec la couche précédente. Ces cellules renferment toutes les inclusions habituelles : réticulum endoplasmique, corps de Golgi, gouttelettes graisseuses, mitochondries, etc...

Peu de travaux ont été entrepris sur sa nature chimique. Ce serait une protéine associée à des quinones polyphénoliques plutôt qu'une protéine tannée. On n'y trouve ni glycogène, ni kératine, ni chitine, mais des mucopolysaccharides polymérisés, quelques lipides, beaucoup de 1,2 glycols, des protéines, de nombreux enzymes, en particulier des phosphatases acides et alcalines surtout dans les proglottis mûrs ; le scolex ne renferme pas de phosphatases alcalines.

3°) Pénétration et mode d'action des anthelminthiques

L'imprécision semble encore régner au sujet de la structure histologique et chimique des téguments. Pourtant leur rôle est capital pour un organisme dépourvu d'appareil digestif, donc réduit à absorber ses éléments nutritifs à travers la paroi de son corps.

Quant au mécanisme d'action, il est étudié par BUEDING et coll. (1957) (5) qui soumettent Schistosoma mansoni à des diamino-dibenzyl-alcanes : les changements dans la motilité des vers sont précédés par une diminution du prélèvement du glucose. A cause de l'absence d'effet direct de ces amines sur les enzymes qui interviennent dans le métabolisme hydrocarboné du parasite, ces auteurs y voient une interférence avec le prélèvement ou le transport actif du glucose exogène dans le ver. Il reste à déterminer si l'action paralysante de ces composés sur les Schistosomes est basée sur leur effet inhibiteur au niveau du prélèvement du glucose.

Il a aussi été démontré que les caractéristiques biochimiques des Helminthes varient beaucoup d'une espèce à l'autre : la nature de leurs enzymes n'est pas forcément identique. Ces différences peuvent expliquer pourquoi certains dérivés étudiés (tableau XXXI) qui sont hautement actifs contre Syphacia obvelata sont dépourvus d'activité contre Hymenolepis nana.

4°) Conclusion

Bien qu'il ne soit pas défini de façon précise, le revêtement cuticulaire des Plathelminthes n'est pas imperméable. C'est une couche de cytoplasme vivant qui a des portions nuclées dans le parenchyme. Son ultrastructure suggère qu'il est profondément lié à la nutrition du parasite ; mais actuellement il paraît évident que les phénomènes d'osmose ne sont pas seuls en jeu. Nous rappelons, sans pour le moment mentionner leur rôle, la présence en nombre parfois considérable de vacuoles et vésicules, dont l'origine pinocytaire ou phagocytaire est presque certaine.

La cuticule des Némathelminthes semble plutôt destinée à empêcher l'entrée des substances du milieu extérieur. L'absorption des aliments se fait à travers la paroi intestinale, dont les cellules épithéliales possédent des microvillosités à leur surface externe (ROGERS, 1962).

Etant donné la faible quantité d'éléments lipoïdes, ces deux revêtements sont à prédominance hydrophile. D'autre part, la présence d'enzymes montre qu'ils ne sont pas une sécrétion inerte, mais une structure métaboliquement active.

Indépendamment de la structure du tégument cuticulaire qui est relativement bien étudiée, sa nature chimique et son arrangement moléculaire sont fort mal connus. Rien ne nous permet, à l'heure actuelle, d'interprêter correctement les résultats obtenus.

III

PERSPECTIVES NOUVELLES

En 1955 DUVE découvre, dans le foie de rat, des granules riches en enzymes hydrolytiques, surtout en phosphatase acide : il les appelle lysosomes. Ultérieurement on y met en évidence : protéase, cathepine, β - glycuronidase, ARN-ase, ADN-ase.

On sait maintenant que la membrane du lysosome laisse passer certaines particules (HAINES et WYNN, 1966), donc qu'elle est douée d'une perméabilité sélective ; mais on sait aussi qu'elle peut concentrer d'autres particules, parfois même agir sur leur structure, et les libérer ensuite.

Il paraît trop simple à ALLISON (1968) (1) de considérer cette membrane comme une lipoprotéine. Sa perméabilité est sans doute en relation avec une ATP-ase complexe, capable de changer sa configuration moléculaire en fonction de la balance ADP - ATP.

L'identification cytologique des lysosomes est difficile, et leur connaissance encore imprécise, à la fois à cause de leur hétérogénéité et le peu de temps écoulé depuis leur découverte. Au microscope électronique THREADGOLD (1967) (26) caractérise quatre grands groupes :

- le granule de stockage, avec un contenu relativement homogène, et une localisation périphérique de l'enzyme ;
- la vacuole autophage, qui renferme mitochondries et réticulum endoplasmique en dégénération, et des enzymes répartis au hasard ;
- le corps résiduel avec des figures de myéline, et une distribution périphérique des enzymes.

Cependant, beaucoup de formes intermédiaires rendent la classification mal aisée. D'autres structures seraient des représentations morphologiques possibles des lysosomes :

- des corps à membrane simple qui dérivent des corps de Golgi,
- des vésicules pinocytaires et phagocytaires ;
- des corps multi-vésiculaires, englobant de petites vésicules de 200 à 500 Å de diamètre.

De tels corps ont été identifiés dans de nombreux tissus appartenant aux espèces animales les plus variées, tant vertébrées qu'invertébrées.

On sait que (1) le tétrachlorure de carbone administré à des rats, endommage la membrane des lysosomes du foie, et que les enzymes en sont chassés. Les effets anthelminthiques du tétrachlorure de carbone et du tétrachloro-éthylène pourraient avoir une base similaire : l'intestin des Nématodes est un tube entouré d'une couche de cellules dont certaines granulations fixent des colorants vitaux ; il semble qu'il s'agisse de lysosomes. Selon ALLISON, l'intestin des Nématodes serait un exemple intéressant d'un organe digestif spécialisé dans la digestion intracellulaire du type lysosomal.

Le rôle de ces corpuscules, leur système de membrane, leur contenu, sont mal connus. Il a été montré, chez quelques animaux, que des substances influent sur leur activité. Nos recherches bibliographiques ne nous ont permis de savoir ni si l'action de produits anthelminthiques a été confirmée et précisée, ni si ces granulations ont été mises en évidence chez les Insectes. Cependant, nous croyons qu'il y a là une orientation nouvelle non négligeable , et que des travaux sur ce sujet seraient susceptibles de fournir des résultats importants, tant du point de vue des effets anthelminthiques que, peut-être, du pouvoir insecticide .

CONCLUSIONS GENERALES

Nous étudions l'activité insecticide de contact de plusieurs dérivés du diphényl-trichloréthane, qui diffèrent du D.D.T. par la nature des groupements substitués sur les noyaux aromatiques :

- groupements hydroxyles bloqués par éthylation ;
- groupements hydroxyles libres à la place du chlore fixé sur les noyaux ;
- radicaux méthyles en méta par rapport aux groupements hydroxyles libres ;
- radicaux isopropyles en ortho par rapport aux groupements hydroxyles libres ;
- fixation simultanée des deux derniers radicaux sur une même molécule.

Ces substances sont :

- le 4,4' diéthoxy-diphényl-trichloréthane ;
- le 4,4' dihydroxy-diphényl-trichloréthane ;
- le di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
- le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane ;
- le dithymyl-trichloréthane.

Le D.D.T. a été étudié uniquement comme élément de référence.

L'étude expérimentale de chacun de ces corps a été réalisée sur les Insectes suivants :

1°) Calliphora erythrocephala (Diptère) adultes
2°) Anopheles stephensi (Diptère) adultes
3°) Anopheles stephensi (Diptère) larves
4°) Rhodnius prolixus (Hétéroptère) adultes
5°) Rhodnius prolixus (Hétéroptère) nymphes
6°) Blatella germanica (Orthoptère) adultes

L'Insecte, suivant le type de préparation choisi, entre en contact avec la substance active, qu'elle se présente :

- soit sous forme de cristaux déposés sur un support par évaporation d'un solvant volatil (Calliphora, Anopheles adultes, Blatella) ;
- soit sous forme de suspensions cristallines en milieu aqueux (Anopheles larves) ;
- soit en solution dans une huile végétale (Rhodnius adultes et nymphes).

De l'ensemble des résultats obtenus nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- le diéthoxy-diphényl-trichloréthane se montre, en général, bon insecticide ;
- le dihydroxy-diphényl-trichloréthane est inactif à l'égard des Insectes envisagés ;
- le di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane et le di (ortho-isopropyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane se révèlent d'une nocivité très légère à l'égard des formes immatures soumises à leur action ;
- le dithymyl-trichloréthane est inefficace contre ces Insectes sauf sur Anopheles stephensi adultes où la puissance de son action paraît être comparable à celle du D.D.T. ;
- les associations D.D.T. + di (méta-méthyl-hydroxy) diphényl-trichloréthane à l'égard de Rhodnius (nymphes), D.D.T. + dihydroxy-diphényl-trichloréthane et D.D.T. + dithymyl-trichloréthane vis-à-vis d'Anopheles stephensi (larves), sont synergiques.

Ainsi, des cinq nouveaux corps étudiés, le diéthoxy-diphényl-trichloréthane manifeste les propriétés insecticides les plus marquées et les plus étendues. Le dithymyl-trichloréthane limite son action à la phase adulte d'une seule espèce. De plus, la toxicité de ces deux substances à l'égard de la Souris est extrêmement faible comparée à celle du D.D.T. Tout cela nous permet d'espérer qu'une étude plus complète sera réalisée, et d'envisager des possibilités pratiques d'utilisation pour la lutte contre les Insectes.

Il est évident que l'exploration systématique des substances éventuellement insecticides n'est pas rationnelle. Pourtant, en dépit d'une utilisation massive et de vingt années de recherches incessantes, le mode exact d'action du D.D.T. en particulier, et des insecticides de contact en général, reste une énigme. Beaucoup de travaux réalisés jusqu'à ce jour sont en contradiction les uns avec les autres et les idées émises sont fréquemment critiquées.

L'analyse des données obtenues au cours de cette expérimentation, les essais de comparaison entre la structure du revêtement cuticulaire des Insectes et des Helminthes ainsi que sa nature chimique, l'énoncé des théories relatives à la pénétration des substances, ne nous permettent pas de tirer des conclusions valables quant à l'influence des substituants sur la nocivité des molécules. Nous estimons que de nombreux travaux sur la physiologie des Insectes et des Helminthes sont encore nécessaires, et qu'il faudrait envisager tout spécialement une étude approfondie des lysosomes.

B I B L I O G R A P H I E

1. - ALLISON A.

The role of Lysosomes in the action of drugs and hormones. Advances in chemotherapy, 1968, 3, 253-302.

2. - AMYOT B.

Etude expérimentale du pouvoir anthelminthique de nouveaux dérivés du diphényl-méthane.
Thèse Pharmacie, mention état, Bordeaux 1967.

2 Bis - BAILENGER J., AMYOT B.

Etude expérimentale du pouvoir anthelminthique de nouveaux dérivés du diphényl-méthane.
Thérapie, 1967, 22, 285-296

3. - BAILENGER J., DAYRAUT B.

Etude expérimentale du pouvoir anthelminthique de nouveaux dérivés du diphényl-trichloréthané.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1968, 107, 149-156.

4. - BAILENGER J., DAYRAUT B.

Influence de quelques radicaux substitués dans les noyaux aromatiques du diphényl-trichloréthane sur son activité anthelminthique.
Thérapie, 1969, XXIV, 343-352.

5. - BUEDING E., SWARTZWELDER C.
Anthelmintics
Pharmacological Reviews, 1957, 9, n° 3, 329-365.

6. - DAYRAUT B.
Etude expérimentale du pouvoir anthelminthique de nouveaux dérivés du diphényl-trichloréthane.
Thèse Pharmacie, mention Université, Bordeaux 1968.

7. - DHINGRA D.R., KAPOOR S.N., KACKER P.N.
J. Proc. Inst. chemists, 1953, 25, 171-173.

8. - DOBY J.M., DEBLOCK S.
La sensibilité aux insecticides de synthèse. Aperçu des différents facteurs qui la conditionnent.
Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne, 1957, XXXII, 129-189.

9. - DOBY J.M., CORBEAU J.
Etude critique de la méthode standard de l'O.M.S. pour la détermination de la sensibilité des larves de moustiques aux insecticides.
Bull. Org. Mond. Santé, 1962, 27, 189-197.

10. - DOBY J.M.
La résistance aux insecticides de contact.
Bulletin de la Société de Pharmacie de l'Ouest, 1963, n° 3, 49-66.

11. - GRASSE P.P.
Les Insectes.
Traité de Zoologie, X, fasc. I et II, 1951, Masson éd.

12. - GRASSE P.P.
Les Plathelminthes
Traité de Zoologie, IV, fasc. I, 1961, Masson éd.

13. - GRASSE P.P.
Les Némathelminthes.
Traité de Zoologie, IV, fasc. II, 1965, Masson éd.

14. - JAGER E.
Berichte der deutschen chemischen Gesellsachft, 1874, 7, 1197-1200.

15. - LEE D.L.
The structure and composition of the Helminth cuticle.
Advances in Parasitology, 1966, 4, 187-237.

16. - LEVY J.C.
Méthodes d'études des insecticides.
Produits et Problèmes pharmaceutiques, 1967, 22, n° 9, 696-703.

17. - LHOSTE J.
La lutte chimique contre les Insectes nuisibles.
Lutte chimique. Institut de phytopharmacie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille, 1966, 165-182.

18. - MEER E.
Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1874, 7, 1200-1203.

19. - METCALF R.L., FUKUTO T. R.
The comparative toxicity of D.D.T. and analogues to susceptible and resistant Houseflies and Mosquitos.
Bull. of the World Health Organization, 1968, 38, n° 4, 633-647.

20. - O.M.S.
Méthodes proposées pour déterminer la sensibilité ou la résistance des Mouches domestiques aux insecticides.
Série de Rapports techniques, 1963, 265, 103-106.

21. - O.M.S.
Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des Moustiques adultes aux insecticides.
Série de Rapports techniques, 1963, 265, 45-53.

22.- O.M.S.
Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de Moustiques aux insecticides.
Série de Rapports techniques, 1963, 265, 55-60.

23.- O.M.S.
Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des Triatomidés aux insecticides.
Série de Rapports techniques, 1963, 265, 73-78.

24.- O.M.S.
Méthode proposée pour la détermination de la sensibilité ou de la résistance des Blattes aux insecticides.
Série de Rapports techniques, 1963, 265, 135-138.

25.- O.M.S.
Critères et signification des épreuves pour la détermination de la sensibilité ou de la résistance des Insectes aux insecticides.
Série de Rapports techniques, 1963, 265, 143-146.

26.- THREADGOLD L.T.
The ultrastructure of the Animal Cell.
International series of Monographs in Pure and Applied Biology, 1967, 37.

27.- VICKERMAN K.
Electron microscopy of parasites.
Techniques in Parasitology - First Symposium of the British Society for Parasitology, 1963, 74-84.

28.- WEBB J.E., GREEN R.A.
On the penetration of insecticides through the Insect cuticle.
The Journal of Experimental Biology, 1945, 22, 8-20.

29.- WIGGLESWORTH V.B.
Biological Reviews, 1948, 23, 408-454.

TABLE DES MATIERES

PAGE

INTRODUCTION..... 1

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. - SYNTHESES..... 5

II. - CARACTERES GENERAUX..... 7

III.- TOXICITES..... 7

IV. - ACTIVITES ANTHELMINTHIQUES..... 8

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

I. - ETUDE SUR CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA 14

A - Conditions d'élevage 14

B - Principe..... 15

C - Méthode d'étude..... 15

1°) Matériel..... 15

2°) Technique..... 16

D - Résultats..... 17

1°) Tableaux..... 17

2°) Interprétation..... 2

II. - ETUDE SUR ANOPHELES STEPHENSI..... 25

A - Conditions d'élevage..... 25

B - Principe..... 25

C - Méthode d'étude..... 26

1°) Matériel..... 26

2°) Technique..... 26

PAGES

D - Résultats..... 28
1°) Tableaux..... 28
2°) Interprétation..... 37

III. - ETUDE SUR LES LARVES D'ANOPHELES STEPHENSI..... 38
A - Principe..... 38
B - Méthode d'étude..... 38
C - Résultats..... 39
1°) Produits purs..... 41
a) Préparation des dilutions..... 41
b) Tableaux..... 41
c) Interprétation..... 46
2°) Mélanges de deux produits..... 46
a) Préparation des dilutions..... 47
α - dilutions du D.D.T. et du diéthoxy. 47
β - dilutions des autres dérivés..... 47
γ - composition des mélanges..... 47
b) Interprétation..... 52

IV. - ETUDE SUR RHODNIUS PROLIXUS..... 54
A - Conditions d'élevage..... 54
B - Principe..... 55
C - Méthode d'étude..... 56
D - Résultats..... 57
1°) Produits purs..... 57
a) Tableaux..... 59
b) Interprétation..... 64
2°) Mélanges de deux produits..... 65
a) Action sur les adultes..... 66
α - tableaux..... 66
β - interprétation..... 69
b) Action sur les nymphes..... 69
α - tableaux..... 69
β - interprétation..... 72

PAGES

V. - ETUDE SUR BLATELLA GERMANICA..... 7
A - Conditions d'élevage..... 7
B - Principe..... 7
C - Méthode d'étude..... 7
1°) Matériel..... 7
2°) Technique..... 7
D - Résultats..... 7
1°) Tableaux..... 7
2°) Interprétation..... 7

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION

I. - ETUDE COMPAREE ET SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS..... 81
1°) Pouvoir insecticide..... 81
2°) Pouvoir anthelminthique..... 83
3°) Toxicité..... 85
4°) Synthèse des résultats obtenus..... 86

II. - RAPPORTS ENTRE ACTIVITE ET STRUCTURE CUTICULAIRE..... 89
A - Cas des Insectes..... 89
1°) Structure de la cuticule..... 89
2°) Pénétration et mode d'action des Insecticides.. 91
3°) Conclusion..... 93
B - Cas des Vers..... 93
1°) Structure de la cuticule des Nématodes..... 9
2°) Structure de la "cuticule" des Cestodes..... 9
3°) Pénétration et mode d'action des anthelminthiques 9
4°) Conclusion..... 9

III. - PERSPECTIVES NOUVELLES..... 9

CONCLUSIONS GENERALES..... 10

BIBLIOGRAPHIE..... 103